

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS QUE CONTRIBUEM PARA O
ESTABELECIMENTO DO NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO (*BURSAPHELENCHUS
XYLOPHILUS*)**

DISSERTAÇÃO

Ângela Rebelo de Almeida Mendes
Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS QUE CONTRIBUEM PARA O ESTABELECIMENTO DO NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO (*BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*)

**Dissertação orientada por Professora Doutora Cristina Maria Filipe Máguas da Silva
Hanson e por Professora Doutora Otilia da Conceição Alves Correia Vale de Gato**

Ângela Rebelo de Almeida Mendes
Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental

2012

Agradecimentos

Dedico esta tese a todos os que me acompanharam e que directa ou indirectamente permitiram que chegasse até aqui. A todos, um muito obrigada! Em particular:

À Professora Cristina Máguas e à Professora Otília Correia, por terem aceite orientar a minha tese e permitirem o meu contacto com este tema. Pelos conselhos e ensinamentos partilhados. Em especial, pela aprendizagem que me proporcionaram em Fisiologia vegetal.

À equipa da Professora Isabel Abrandes, pela partilha de conhecimento e em particular ao Luís Fonseca e ao André na sua preciosa ajuda com a inoculação.

À Alexandra e a toda a equipa do ISA, pela partilha de ensinamentos e pelo trabalho de campo.

Aos meus pais, por toda a educação e valores que me transmitiram, pelo apoio e por todo o empenho na minha formação. Pelos miminhos que fazem encurtar a distância. Por toda a amizade e amor que sempre me dedicaram e que aqui retribuo!

À minha mana Inês e ao meu cunhado Paulo, pelo apoio, carinho e amizade.

À minha avó Dulce, pela sua preocupação.

Ao André, pela grande ajuda no trabalho de campo, pelo incentivo, compreensão e amizade. Por mais uma vez me acompanhares nesta etapa!

À Carolina, à Isabel e ao Carlos, por todo o apoio e amizade.

Aos colegas da Seguro Directo pela camaradagem; a toda a supervisão, em especial à Suzana Bernardo, pela compreensão e flexibilidade que permitiram realizar o meu trabalho de campo, e pelo apoio ao longo desta caminhada repartida entre a faculdade e a SD.

Aos colegas de curso e do departamento, pelo companheirismo, ajuda e partilha de conhecimento.

Ao EPPC, Herdade da Apostiça e Herdade de Pinhal das Freiras, por permitirem a realização do trabalho de campo.

E “last but not the least” um profundo agradecimento, à Patrícia Fernandes. Agradeço toda a disponibilidade, a partilha de conhecimento e ajuda no tratamento de dados. Procuro palavras para agradecer as árduas madrugadas de medições de pre-dawn. A paciência e companheirismo ao longo de todo o trabalho na estufa, os pequenos-almoços pela alvorada... jamais esquecerei a tua dedicação e apoio.

Obrigada!

RESUMO

O nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, foi descoberto pela primeira vez em Portugal em 1999, desde então vários estudos têm sido efectuados com intuito de melhorar o conhecimento da sua interacção com o hospedeiro e o seu vector, *Monochamus galloprovincialis*, em Portugal. É a coexistência de árvores hospedeiras, por norma associadas a coníferas, do género *Pinus*, do nemátode e do insecto vector, que dita a existência da doença, uma vez que para se fazer transportar de árvore para árvore o nemátode necessita de um vector. Para além destas interacções biológicas é fundamental conhecer as condições abióticas que estão associadas ao estabelecimento do nemátode da madeira do pinheiro, como é o caso da temperatura e disponibilidade hídrica, a fim de prever a existência de árvores afectadas, de modo a otimizar a gestão dos pinhais e da própria doença, através dos meios de combate adequados. Para tal é fundamental estudar a resposta fisiológica das diferentes espécies de pinheiro para tentar prever precocemente a existência de sintomas.

O presente trabalho tem como principal objectivo avaliar os factores ambientais que influenciam o estabelecimento e potencial infeccioso do nemátode da madeira do pinheiro, em três espécies de *Pinus* (*Pinus pinaster*, *Pinus pinea* e *Pinus radiata*). Pretende-se com o mesmo estudar in loco as condições ambientais que interferem na infecção de *Pinus pinaster* e a vitalidade dos pinhais infectados. Pretende-se ainda testar diferentes temperaturas e diferentes condições hídricas no potencial infeccioso do nemátode nas três espécies de pinheiro seleccionadas.

Os resultados sugerem maior vitalidade em pinhais sujeitos a maior gestão de matos e corte de árvores com sintomas de nemátode. Sugerem também que *P. pinaster* e *P. radiata* são espécies susceptíveis à infecção de *B. xylophilus*, em oposição a *P. pinea*, que é uma espécie resistente. Verificou-se o papel da temperatura e disponibilidade de água no desenvolvimento da doença, nas espécies susceptíveis. Estes resultados alertam para o alastramento da doença a outras espécies que actualmente não são infectadas e para o alargamento da área infectada, de acordo com as previsões de alterações climáticas, de aumento de temperatura e de períodos de seca prolongado.

Palavras chave: *Bursaphelenchus xylophilus*, Vitalidade, Potencial hídrico, Trocas gasosas, Condições ambientais.

ABSTRACT

The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, was first reported in Portugal in 1999, since then several studies have been conducted with the aim of improving knowledge of its interaction with the host and its vector, *Monochamus galloprovincialis*, in Portugal. It is the coexistence of host trees, normally associated with conifers, the genus *Pinus*, the nematode and insect vector, which dictates the presence of the disease, once to move to the tree to the tree requires a nematode vector. In addition to these biological interactions it is important to know the abiotic conditions that are associated with establishment of the pine wood nematode, such as temperature and water availability to provide the existence of affected trees in order to optimize the management of pine forests and the disease by appropriate means. For this is essential to study the physiological response of different pine species to predict the existence of early symptoms.

The main objective of this work is to assess the environmental factors that influence the establishment and infection potential of the pine wood nematode in three *Pinus* species (*Pinus pinaster*, *Pinus pinea* and *Pinus radiata*). It is intend to study in situ environmental conditions that interfere with infection of *Pinus pinaster* and vitality of infected pine. Another objective it is to test different temperatures and different water conditions in infection potential of the nematode in the three pine species selected.

The results suggest a greater vitality in pine forests subject to greater management of woods and cut trees with symptoms of nematode. It also suggests that *P. pinaster* and *P. radiata* are susceptible species to infection by *B. xylophilus*, as opposed to *P. pinea*, which is a resistant species. It was found the role of temperature and water availability in the development of the disease in susceptible species. These results emphasize the spread of disease to other species that are not currently infected and the enlargement of the infected area, according to the predictions of climate change, temperature rise and prolonged periods of drought.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*, Vitality, Water potential, Gas exchange rate, Environmental conditions.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I.....	5
AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS E DO ESTADO DE VITALIDADE DE PINHAIS DE <i>Pinus pinaster</i> , EM CONDIÇÕES NATURAIS.....	5
1.1. INTRODUÇÃO	6
1.2. METODOLOGIA	8
1.2.1. Caracterização dos locais de estudo.....	8
1.2.2. Caracterização das condições climáticas da região de Setúbal.....	9
1.2.3. Caracterização dos pinhais	13
1.2.4. Avaliação do potencial infeccioso do insecto.....	14
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
1.3.1. Avaliação do estado de vitalidade dos pinhais de <i>Pinus pinaster</i>	16
1.3.2. Avaliação do potencial infeccioso do insecto vector	21
1.4. CONCLUSÃO	24
CAPÍTULO II	25
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE FACTORES AMBIENTAIS NO POTENCIAL DE INFECCÃO PELO <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>pinus</i>	25
2.1. INTRODUÇÃO	26
2.2. METODOLOGIA.....	28
2.2.1. Desenho experimental	28
2.2.1.1. Inoculação	29
2.2.1.2. Monitorização pós inoculação.....	29
2.2.1.3. Análise estatística.....	30
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.3.1. Caracterização inicial.....	31
2.3.2. Monitorização das condições ambientais: temperatura, humidade relativa do ar e radiação ..	32
2.3.3. Monitorização do conteúdo hídrico do solo	35
2.3.4. Desenvolvimento de sintomas (escala sintomatológica)	38
2.4. CONCLUSÃO	49

CAPÍTULO III.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	50
5. Bibliografia	52
ANEXOS.....	57

ÍNDICE DA FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica dos locais de estudo: Pinheiros da Cruz, Pinhal das Freiras e Herdade da Apostiça.

Figura 2. Diagrama termopluviométrico apresentando a variação da temperatura média mensal (C°) e precipitação total mensal (mm), valores médios de 1971/2000, para a estação de Setúbal (fonte I.M.I.P. (www.meteo.pt)). (Alt. – altitude; T med – temperatura média anual; P – precipitação total).

Figura 3. Dados climáticos registados na estação meteorológica de Alcácer do Sal, entre Fevereiro de 2010 e Setembro de 2011. A – Temperatura média, máxima e mínima (°C); B – Precipitação total (mm).

Figura 4. Dados climáticos registados na estação meteorológica de Setúbal, entre Janeiro de 2010 e Setembro de 2011. A – Temperatura (°C); B – Precipitação total (mm).

Figura 5. Escala de sintomatologia – representação visual correspondente a cada estágio (Proença et al. 2010).

Figura 6. Exemplificação da colocação das armadilhas multi-funil no campo, com atractivos (alfa-pineno - tira plástica azul; ipsenol -invólucro branco).

Figura 7. Representação da vitalidade dos pinhais de *Pinus pinaster*, com base na escala de sintomatologia (ver Fig. 5). PC1, PC2 e PC3 parcelas 1, 2 e 3 de Pinheiro da Cruz; PF4, PF5 e PF6 parcelas 4, 5 e 6 de Pinhal das Freiras; HA7, HA 8 e HA 9 parcelas 7, 8 e 9 de Herdade da Apostiça.

Figura 8. Representação do número de insectos (*Monochamus galloprovincialis*), capturados nos três locais de estudo, Pinheiro da Cruz (PC), Pinhal das Freiras (PF) e Herdade da Apostiça (HA). A – capturas efectuadas em 2010; B – capturas efectuadas em 2011, onde N representa a não recolha nos locais e datas assinalados.

Figura 9. Representação dos valores médios e do desvio padrão da altura, altura fotossintética e diâmetro das plantas das espécies em estudo. A – estufa a 25°C. B – estufa a 30°C.

Figura 10. Variação das temperaturas máxima, média e mínimas durante o período experimental, nas estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

Figura11. Variação da humidade relativa do ar (máxima, média e mínima), para as estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

Figura 12. Variação da radiação fotossinteticamente activa (PAR) durante o período experimental, nas estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

Figura 13. Conteúdo hídrico do solo (m^3/m^3), nas estufas de 25°C e 30°C. A – *P. pinaster*; B – *P. pinea*; C – *P. radiata*.

Figura 14. Caracterização do grau de vitalidade dos pinheiros através da escala de sintomatologia em *P. pinaster*, *P. pinea* e *P. radiata*, a 25°C e 30°C, onde: plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+).

Figura 15. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Taxa de transpiração (E) em *Pinus pinaster*, após a inoculação por nemátodo, para as temperaturas de 25°C e 30°C. Plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+). (*) valores significativos entre os tratamentos H+; (*) valores significativos entre os tratamentos H-.

Figura 16. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Transpiração (E) em *Pinus pinea*, durante o período experimental, para as temperaturas de 25°C e 30°C.

Figura 17. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Transpiração (E) em *Pinus radiata*, durante o período experimental, para as temperaturas de 25°C e 30°C.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Estrutura dos pinhais de *Pinus pinaster*, dos locais de estudo. PC – Pinheiro da Cruz, PF – Pinhal das Freiras e HA – Herdade da Apostiça, cada uma representada por 3 parcelas.

Tabela II. Espécies dominantes, regeneração de *P. pinaster* e percentagem do coberto vegetal, nas parcelas dos três locais em estudo.

Tabela III. Valores em percentagem da mortalidade de cada espécie, em cada tratamento, referentes ao estágio IV e V. Em que: plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+).

Tabela IV. Resumo da análise estatística, Teste de Wilks, para as três espécies de *Pinus*, estudo dos efeitos para os factores: temperatura (T), nemátode (N), disponibilidade de água (H), e interacções: temperatura vs nemátode (T*N), temperatura vs disponibilidade de água (T*H), nemátode vs disponibilidade de água (N*H) e temperatura vs nemátode vs disponibilidade de água (T*N*H); com base nas médias do potencial hídrico. Os valores a negrito representam os valores significativos ($p \leq 0,05$).

INTRODUÇÃO GERAL

O Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP) de nome científico *Bursaphelenchus xylophilus* é o agente causal da doença da marchidão dos pinheiros (Mamiya, 1983). Esta doença foi relatada pela primeira vez por Yano (1913) no início do século XX, no Japão (Mota et al., 2006), no entanto só em 1971 é que Kiyohara e Tokushige (1971) relacionaram o nemátode à doença (Mota et al., 2006). Posteriormente espalhou-se para outros países asiáticos como a China, Coreia e Taiwan. Na Europa foi detectado pela primeira vez, em 1999, em Portugal (Mota et al., 1999). Em 2008 foi dado como alastrado a todo o território, apesar de todas as medidas de erradicação adoptadas, passando todo o país a ter classificação de zona afectada (Mota et al., 2009) e em 2009 foi detectado na ilha da Madeira (Vicente et al., 2012). Recentemente foi também detectado em Espanha (Abelleira et al., 2011). *B. xylophilus* foi classificado pela legislação comunitária como um organismo de quarentena, obrigando à adopção de medidas de controlo e erradicação, pelos estados membros que sejam afectados.

Bursaphelenchus xylophilus tem origem da América do Norte, distribuído por todo o Canadá e EUA, onde não causa danos graves nas coníferas nativas, sendo só um agente patogénico em árvores em stress ou recentemente mortas (Wingfield et al., 1986). O comércio mundial de produtos de madeira e toda a actividade humana que envolve a sua circulação está na base da disseminação do NMP (Webster, 2004 in Mota et al., 2006), sendo a forma provável de entrada em Portugal. No entanto a origem do Nemátode da Madeira do Pinheiro em Portugal continua por se confirmar, podendo ter origem na América do Norte ou no Extremo Oriente. Estudos moleculares evidenciam que o isolado do NMP existente em Portugal é mais próximo do isolado da Ásia, do que da América do Norte, facto que relaciona a proveniência do nemátode em Portugal com a Ásia e não directamente com a América do Norte (Mota et al., 2006).

A infecção pelo NMP não apresenta um conjunto específico de sintomas, mas podem identificar-se alguns aspectos externos que as árvores afectadas apresentam. Contudo, a confirmação desta doença só é possível através da análise laboratorial do material lenhoso, visto que outras doenças apresentam sintomas semelhantes. Os pinheiros infectados apresentam inicialmente amarelecimento da copa, marchidão e morte das agulhas. Com o desenvolvimento da doença, os pinheiros ficam com as agulhas vermelho-acastanhadas indiciando a morte da árvore, devido ao bloqueio dos vasos xilémicos e dos traqueídeos pelos nemátodes. Estas alterações morfológicas reflectem-se nos fluxos de água e nutrientes ao nível do xilema e floema e consequentemente ao nível da resposta fisiológica das árvores infectadas.

Os sintomas desenvolvem-se em duas fases distintas. A primeira caracteriza-se por uma destruição ligeira de células no córtex e xilema que se verifica cerca de 7-14 dias após a inoculação (Ichihara et al., 2000). A segunda fase corresponde à multiplicação e migração do *B. xylophilus* ao longo da planta. Dá-se a rápida

expansão da necrose das células do córtex do câmbio e formação de cavitação nos traqueídeos. Por fim a planta morre devido ao bloqueio da condução de água (Mamiya, 1985). O desenvolvimento da doença é acompanhado por aumento de etileno e terpenos pela árvore e exsudação de celulase pelos nemátodes (Suzuki, 2004).

A disseminação da doença apresenta duas dimensões distintas, uma dentro da própria árvore, outra de árvore para árvore. No primeiro caso tem-se verificado que o nemátode se movimenta através dos canais de resina no xilema (Mamiya, 2008). Na dispersão de árvore para árvore, o NMP é transportado por um insecto vector, do género *Monochamus* (família *Cerambycidae*). É o caso de *Monochamus alternatus*, no Japão (Mamiya e Enda 1972) *Monochamus carolinensis* nos Estados Unidos (Linit, 1988) e *Monochamus galloprovincialis*, em Portugal (Sousa et al., 2001).

O nemátode é, não só um organismo micófago, que se alimenta de fungos presentes em madeira morta ou em árvores em declínio, mas é também um organismo fitófago, que se alimenta de células vegetais, especialmente de células de parênquima (Kuroda and Mamiya, 1986, in Mamiya, 2008), concedendo-lhe um grande poder destrutivo. Apresenta cerca de 800µm de comprimento e 22 µm de diâmetro (Agrios, 2005). O ciclo de vida do *Bursaphelenchus xylophilus* é composto por um ciclo propagativo e um ciclo de dispersão (Mamiya, 1984). O primeiro ciclo ocorre no alburno e corresponde a seis fases de vida: ovo, quatro fases de larva de propagação e adulto. Este ciclo ocorre entre 4 a 5 dias, em condições favoráveis de humidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes. O ciclo de dispersão é composto por larvas de terceiro e quarto estado de dispersão, que são transferidas para a árvore hospedeira (Mamiya, 1975). O quarto estado, JIV, corresponde a um estado especializado, conhecido como larva dauer, com características morfológicas e fisiológicas diferentes das restantes fases. Esta fase é resistente a condições adversas, permitindo-lhe sobreviver no insecto vector até atingir uma nova árvore hospedeira (Penas et al., 2006). Durante o Verão, o quarto estado de dispersão é transportado pelo insecto vector das árvores mortas para as árvores hospedeiras. As larvas dauer que invadem a árvore com sucesso transformam-se em adultos, acasalam e a fêmea inicia a oviposição. No Inverno os juvenis do terceiro estado (JIII) agregam-se nas câmaras pupais das larvas de insecto e passam para juvenis de quarto estado. Segue-se a eclosão dos insectos adultos com a fixação das larvas daeur ao interior das suas traqueias, podendo cada insecto transportar cerca de 15000 a 20000 nemátodes (Agrios, 2005). Depois de emergir da árvore, o insecto vector, dado que é um organismo xilófago, vai alimentar-se dos ramos jovens de árvores saudáveis, transmitindo os nemátodes JIVs às árvores hospedeiras, que por sua vez passam à fase adulta, fechando assim o ciclo epidemiológico da doença (Zhao et al., 2008).

A propagação do nemátode e infecção de árvores está intimamente ligada à interacção do nemátode com o insecto, que é benéfica para ambos. Por um lado o nemátode adquire a capacidade de colonizar novos hospedeiros e locais de reprodução, por outro, o insecto torna-se agente primário,

fomentando a existência de novos locais para a sua postura e desenvolvimento, devido ao enfraquecimento e morte dos pinheiros por acção indirecta, através do nemátode.

O *Monochamus* é portador do NMP ainda antes de estar completo o seu estado adulto. Quando a larva do insecto atinge o estado de pupa pré-adulta, os nemátodes presentes na árvore já infectada, passam para a câmara pupal do insecto. Após a emergência do insecto, inicia-se a fase de voo com um período de maturação de duas a três semanas, antes de iniciar a sua actividade sexual. A fase de maturação ocorre em árvores saudáveis e se ocorrer transmissão do nemátode será mais uma árvore enfraquecida e portanto, mais um potencial local para a postura seguinte. Este processo corresponde à transmissão primária, ou seja, a transmissão por via da alimentação ou pasto de maturação. A transmissão secundária ocorre através dos insectos fêmeas, durante a postura dos ovos nos ramos e troncos do pinheiro. Esta forma de contágio não é comum em árvores saudáveis, pois a postura só ocorre em árvores doentes ou já mortas, visto que a oleoresina presente nas árvores vivas funciona como uma defesa para as coníferas, impedindo o desenvolvimento dos ovos (Togashi, 1990). Não só o NMP, mas também factores como o vento, tempestades ou incêndios podem fornecer estas árvores hospedeiras.

A marchidão dos pinheiros verifica-se especialmente em coníferas, sendo as árvores mais afectadas as do género *Pinus*, das quais são exemplo *P. pinaster*, *P. densiflora*, *P. sylvestris*, *P. radiata* e *P. nigra* (Futai e Furuno, 1979, in Jikumaru et al., 2000). Em Portugal dos povoamentos de coníferas existentes apenas se tem mostrado positiva a presença de NMP em *P. pinaster*. Uma vez que 23% da área florestal nacional corresponde a *P. pinaster* (Inventario Florestal nacional, 2005/2006), o NMP torna-se uma ameaça para quase um quarto da floresta portuguesa, com potencial de risco para outras coníferas caso se venha a verificar alterações comportamentais nos intervenientes desta doença. Desta forma se os hábitos alimentares e preferências dos locais de postura do insecto vector se alterarem (uma vez que este prefere *P. pinaster* a *P. pinea*) ou se outros cerambicídeos se tornarem vector do *Bursaphelenchus xylophilus*, poderão existir outras espécies florestais que venham a ser afectadas pelo NMP. É assim importante estudar a susceptibilidade de outras espécies de *Pinus* à infecção pelo NMP e avaliar as condições ambientais que potenciam o desenvolvimento da doença, dada a multiplicidade de intervenientes. Pois a doença do NMP é o resultado da interacção do próprio nemátode, com o insecto vector e com a árvore hospedeira, sendo ainda influenciada por factores bióticos e abióticos.

O presente trabalho tem como principal objectivo avaliar os factores ambientais que influenciam o estabelecimento e potencial infeccioso do nemátode da madeira do pinheiro, em três espécies de *Pinus* com potencial de risco associado (*Pinus pinaster*, *Pinus pinea* e *Pinus radiata*). Pretende-se estudar *in loco*, as condições ambientais que interferem na infecção de *Pinus pinaster* e o estado de vitalidade dos pinhais infectados, assim como testar diferentes temperaturas e disponibilidade de água ao nível do solo no potencial infeccioso do nemátode nas três espécies de pinheiro seleccionadas.

De modo a cumprir o objectivo inicial, o trabalho incidirá em duas tarefas específicas: (i) avaliação das condições ambientais e do estado de vitalidade de plantações de *Pinus pinaster*, do sul de Portugal, na península de Setúbal, local onde foi identificado o NMP pela primeira vez em Portugal; (ii) avaliação em condições controladas dos factores ambientais que potenciam o potencial infeccioso do NMP nas três espécies de *Pinus* seleccionadas.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS E DO ESTADO DE VITALIDADE DE PINHAIS DE *Pinus pinaster*, EM CONDIÇÕES NATURAIS

1.1. INTRODUÇÃO

A avaliação da vitalidade em plantações de *Pinus pinaster* é importante para conhecer a susceptibilidade e estabelecimento do nemátode (*Bursaphelenchus xylophilus*) e o grau de infecção em cada local. O conhecimento sobre as condições ambientais que poderão favorecer o desenvolvimento do insecto vector (*Monochamus galloprovincialis*) e o potencial infeccioso do nemátode que levam a uma maior ou menor vitalidade dos pinhais, pode ser fundamental para o estabelecimento de critérios de gestão e combate da doença do nemátode da madeira do pinheiro (NMP).

De facto, estudos levados a cabo por Francardi e Pennacchio (1996, in Naves e Sousa, 2008) demonstram que o desenvolvimento de *M. galloprovinciales* pode estar dependente das condições climáticas prevalentes em cada região. Estes autores verificaram que o insecto vector apresenta uma geração única por ano em Itália enquanto nas regiões mais frias do centro e norte da Europa são necessários dois anos para completar o seu ciclo de desenvolvimento. Em Portugal o seu ciclo de vida também é completado num ano, as fêmeas colocam os ovos em árvores mortas ou enfraquecidas durante o Verão e as suas larvas escavam galerias na madeira onde permanecem em dormência durante o Inverno (Naves et al., 2007). No final do Inverno é retomado o desenvolvimento larvar, seguindo-se o período de emergência, usualmente entre Maio e Setembro, com um máximo por norma em Julho (Naves et al., 2008). Desta forma, consegue-se avaliar a existência do insecto vector durante os meses de Primavera e Verão, coincidentes com o período de emergência, através da colocação de armadilhas no campo, durante esta época, interceptando os insectos em voo.

Tanto as fêmeas, como os machos de *Monochamus galloprovincialis* são atraídos por misturas de voláteis de pinheiro e compostos utilizados em componentes de feromonas de insectos do género ips (Pajares et al., 2010), que coabitam frequentemente com os *Monochamus*. Os voláteis mais utilizados são monoterpenos que simulam árvores em decadência ou mesmo mortas. Desta forma as armadilhas são colocadas no campo com atractivos para aumentar o potencial de captura. Frequentemente é utilizado alfa-pineno como monoterpeno e o ipsenol e 2-metil-3-butenol-2-ol (metil butenol) usados como feromonas. Estudos recentes revelam que 2-undecyloxy-1-etanol (comercialmente conhecido como galloprotec) é um dos compostos produzidos especificamente pelos machos adultos de *M. galloprovincialis*, que atrai as fêmeas, produzindo resposta também nos machos, aumentando o número de capturas em 80 a 140% (Pajares et al., 2010). Assim este composto apresenta maior eficácia do que metil butenol. Pelo facto de não se conhecer este composto no momento em que foi planeado o primeiro ano deste trabalho (artigo publicado em Maio de 2010), conjuntamente com o reduzido número de capturas num dos locais de estudo, face ao estado de vitalidade aparente, optou-se por alterar o atractivo nesse local.

Estudos laboratoriais levados a cabo para estimar intervalos de temperatura coincidentes com o desenvolvimento das larvas de *M. galloprovincialis* pós-dormência, indicam que a temperatura favorável ao seu desenvolvimento é entre os 15 e os 30°C. Temperatura acima da qual o desenvolvimento larvar diminui e é letal entre 32 e 35°C (Naves e Sousa, 2008). Para além da bibliografia referida, não existem muitos estudos que definam limites de temperatura ou as condições favoráveis à dispersão de *M. galloprovincialis*, apenas se sabe que factores abióticos como temperatura elevada e reduzida precipitação são favoráveis à sua existência nos pinhais.

O objectivo desta tarefa é avaliar *in loco*, as condições ambientais e o estado da vitalidade de pinhais de *Pinus pinaster*, infectados com nemátode, de modo a relacionar as condições detectadas com o grau de infecção.

1.2. METODOLOGIA

Em cada um dos pinhais seleccionados para este estudo (Pinheiro da Cruz, Pinhal das Freiras e Herdade da Apostiça) foi avaliada a estrutura dos pinhais e o seu estado de vitalidade. Em cada pinhal foi ainda avaliado o potencial de infecção pelo insecto vector do nemátode (*Monochamus galloprovincialis*) através da captura dos insectos.

1.2.1. Caracterização dos locais de estudo

Os locais de estudo escolhidos situam-se no sul de Portugal, na península de Setúbal, onde foi identificado pela primeira vez o foco da infecção do nemátode da madeira do pinheiro na Europa. Os pinhais seleccionados situam-se em Pinheiro da Cruz (PC), Pinhal das Freiras (PF) e herdade da Apostiça (HA). Pinheiro da Cruz (38° 15' N, 8° 44' W) situa-se no concelho de Grândola, no perímetro florestal do estabelecimento prisional de Pinheiro da Cruz. Pinhal das Freiras (38° 34' N, 9° 07' W) localiza-se no concelho do Seixal, contigua à herdade da Apostiça (38° 32' N, 9° 07' W) na zona norte do concelho de Sesimbra, ambas em área de rede Natura 2000 (fig. 1).

Os três locais apresentam uma geologia idêntica, tratando-se de solos de formação arenosa, com elevada permeabilidade, estando inserido em ecossistema dunar.

O coberto vegetal da área em estudo é dominado no estrato arbóreo por pinhais de *Pinus pinaster*, e no estrato arbustivo por matos de tojais-urzais, principalmente dominados por tojos (*Ulex* spp.), urzes (*Erica* spp.), vulgo sargaça (*Halimium* spp.) e estevinha (*Cistus salviifolius*). Os locais escolhidos para amostragem concentram-se nos povoamentos puros de *Pinus pinaster*, dado ser a espécie de *Pinus* positiva para o *Bursaphelenchus xylophilus*.

Nos três locais em estudo não há registo de incêndios, durante o período em estudo 2010-2011 à excepção da herdade da Apostiça, que registou uma ocorrência em Julho de 2011. Em Pinheiro da Cruz ocorreram até 2009 cortes fitossanitários, contudo, durante o mesmo período em estudo não se verificou qualquer corte ou limpeza de matos. Em Pinhal das Freiras têm sido efectuados cortes fitossanitários de forma a controlar a transmissão do NMP a árvores saudáveis. Na herdade da Apostiça também se têm efectuado cortes fitossanitários, por norma no mês de Outubro, por corresponder ao término da época de voo do insecto, de forma a não deixar no campo para o ano seguinte potenciais focos de infecção.

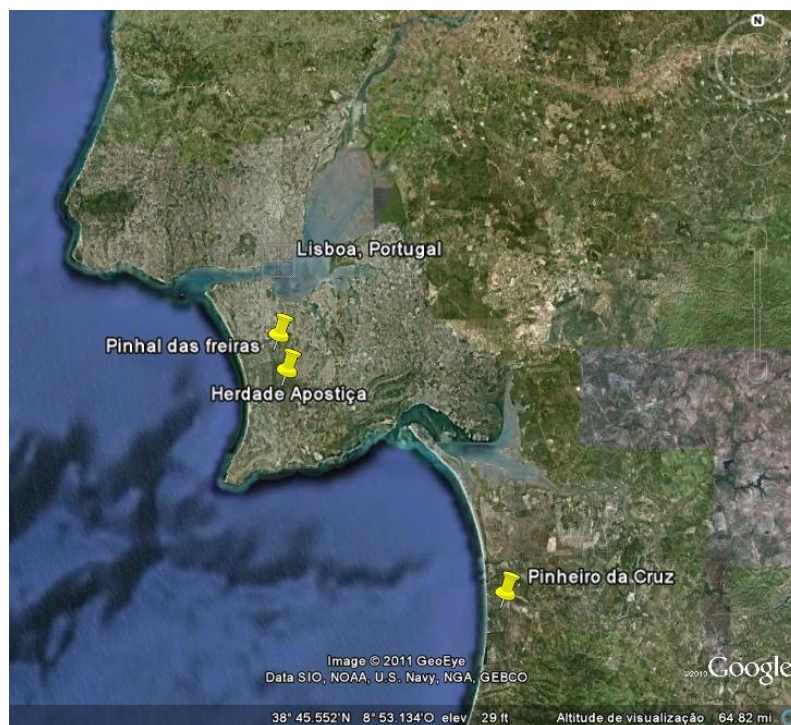


Figura 1. Localização geográfica dos locais de estudo: Pinheiros da Cruz, Pinhal das Freiras e Herdade da Apostiça.

1.2.2. Caracterização das condições climáticas da região de Setúbal

O clima no sul de Portugal é Mediterrânico (Lousã, 2004), apresentando duas estações extremas: Verão quente e seco, com períodos de seca prolongados e Inverno frio e geralmente húmido, caracteristicamente com precipitação média anual e humidade reduzidas.

A caracterização climática da área de estudo foi feita com base nos dados das normais climatológicas 1971/2000, da estação de Setúbal (38° 33'N; 08° 53'W), disponíveis na página do Instituto de Meteorologia, IP (I.M.I.P) (www.meteo.pt), através das quais foi possível construir o climograma representado na fig. 2. Este climograma representa a variação anual dos valores médios da temperatura média do ar e valores de precipitação total mensal. A temperatura média mensal varia entre os 9,9°C registados em Janeiro e 22,7°C, em Agosto. A precipitação mensal varia entre 3,6mm, em Agosto e 128,9mm, registados em Dezembro. Verifica-se uma precipitação total anual de 715,9 mm e uma temperatura média anual de 16,2°C.

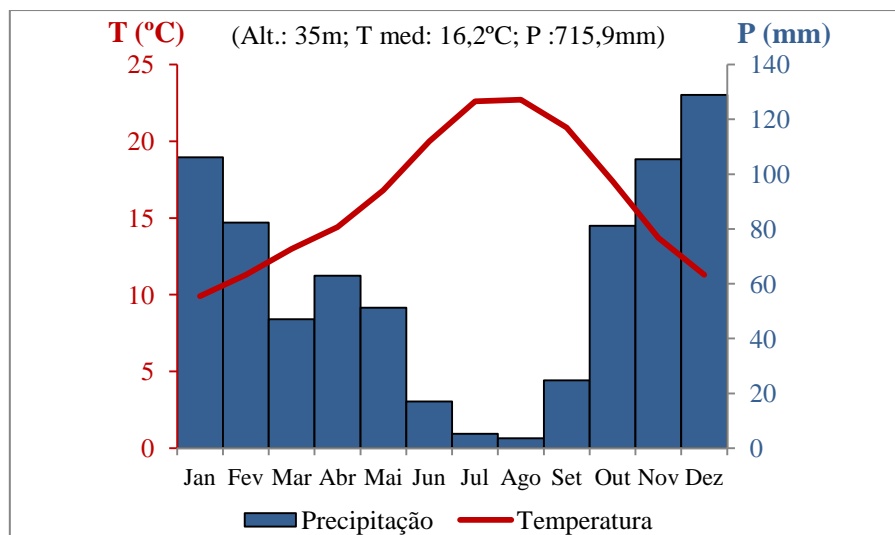


Figura 2. Diagrama termopluiométrico apresentando a variação da temperatura média mensal (°C) e precipitação total mensal (mm), valores médios de 1971/2000, para a estação de Setúbal (fonte I.M.I.P. (www.meteo.pt)). (Alt. – altitude; T med – temperatura média anual; P – precipitação total).

Através de dados climáticos obtidos junto do I.M.I.P referentes à temperatura e precipitação registados nas estações de influência na área de estudo, foi possível efectuar um acompanhamento das condições ambientais a que os pinhais em estudo estiveram sujeitos, durante o período analisado. Obtiveram-se os valores de temperaturas máximas, médias e mínimas e valores de precipitação total, das estações meteorológicas de Alcácer do Sal e de Setúbal, entre Janeiro de 2010 e Setembro de 2011.

A estação meteorológica de Alcácer do Sal (38°22'N; 08°31'W), cujos dados estão representados na fig. 3, foi utilizada como estação de referência do local de estudo de Pinheiro da Cruz. A temperatura média registada nesta estação para o ano de 2010 (registos entre Fevereiro e Dezembro) foi de 17,4°C. A temperatura máxima registada durante este período ocorreu em Julho (34,5°C). Registaram-se cinco meses secos, de Maio a Setembro, onde a precipitação total mensal foi inferior ao dobro da temperatura média mensal. Na mesma estação a precipitação total acumulada durante os meses de Fevereiro a Dezembro de 2010 foi de 540,5 mm. Em 2011, entre Janeiro a Setembro, o valor máximo de temperatura registado ocorreu em Julho, 31,40°C, mês em que a precipitação foi nula. A temperatura média registada durante o período referido de 2011 foi de 18°C. Os meses de Abril, Junho, Julho, Agosto e Setembro consideram-se meses secos. A precipitação acumulada foi de 316,5 mm, registada entre Janeiro e Setembro. Comparativamente ao ano de 2010, há que ter em conta que os dados acumulados reflectem períodos diferentes. Comparando períodos idênticos (de Fevereiro a Setembro), verifica-se que o valor acumulado

de precipitação em 2010 é de 340,10 mm e em 2011 é de 269,30 mm. O que leva a concluir que 2010 foi um ano com maior precipitação.

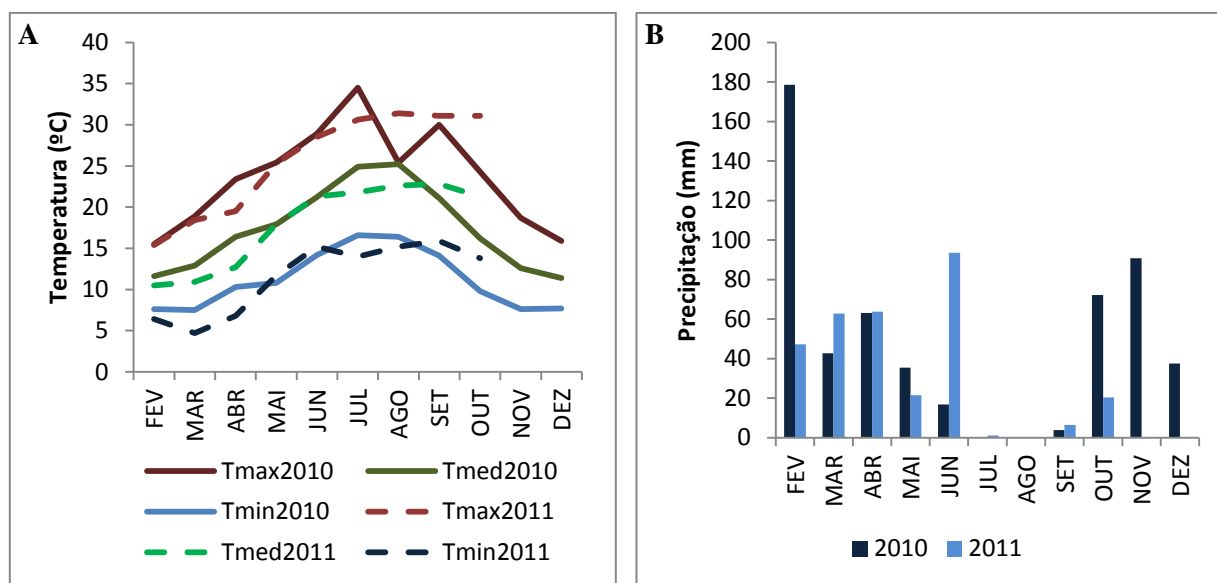


Figura 3. Dados climáticos registados na estação meteorológica de Alcácer do Sal, entre Fevereiro de 2010 e Setembro de 2011. A – Temperatura (°C); B – Precipitação total (mm).

A estação meteorológica de Setúbal (38° 33'N; 08° 53'W) foi utilizada como estação de referência para os locais de Pinhal das Freiras e Herdade da Apostiça, podendo-se verificar os dados climáticos na fig.4, registados entre Janeiro de 2010 e Setembro de 2011. A média da temperatura máxima registada nesta estação, no ano de 2010 foi de 22,2°C, valor máximo ocorrido no mês de Agosto (33°C). A temperatura média foi de 16,4°C e a média da temperatura mínima foi de 11°C, com o valor mais baixo registado no mês de Fevereiro. A precipitação total anual foi de 1014,8 mm (média mensal de 84,57 mm). Verifica-se que os meses de Junho a Setembro foram meses secos. Em 2011, com registos até Setembro, a média da temperatura máxima foi de 24,1°C, com o máximo em Agosto. A temperatura média foi de 17,5°C e a média da temperatura mínima foi de 11,8°C, com o valor mais baixo ocorrido em Fevereiro. A precipitação acumulada de 2011, até Setembro, foi de 471,90 mm (média mensal de 52,43 mm). Os meses secos de 2010, de Junho a Setembro, repetem-se no ano de 2011. Como o registo de dados de precipitação não foi igual nos dois anos em estudo, comparando períodos coincidentes (Fevereiro a Setembro), verifica-se que 2010 regista um total de precipitação de 422,20mm e que 2011 regista 381,60mm.

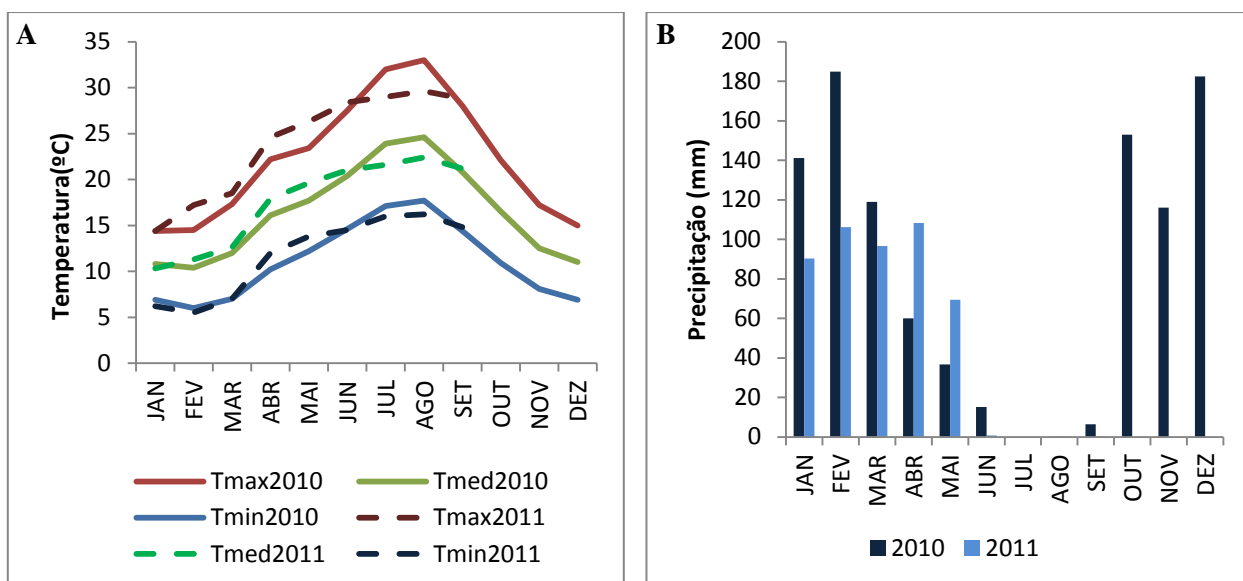


Figura 4. Dados climáticos registados na estação meteorológica de Setúbal, entre Janeiro de 2010 e Setembro de 2011. A – Temperatura (°C); B – Precipitação total (mm).

Comparando os valores de temperatura dos anos de 2010 e 2011, pode-se constatar que tanto em Alcácer do Sal como em Setúbal, 2010 registou temperaturas médias inferiores a 2011. O inverso se verifica para a precipitação, que foi maior em 2010, face a 2011.

Para os dois anos, analisando as temperaturas durante o período de emergência e dispersão do insecto vector (Maio a Setembro) verifica-se que as temperaturas foram ligeiramente superiores em 2010 ($> 0,21^{\circ}\text{C}$). Analisando os valores da precipitação acumulada nestes meses verifica-se a mesma proporcionalidade inversa, onde a precipitação é maior em 2011 do que em 2010 ($> 38,95 \text{ mm}$).

Relativamente aos dados registados nas duas estações meteorológicas, verifica-se que Alcácer do Sal apresenta maior temperatura do que Setúbal. Analisando o mesmo período de registos nos dois anos e nas duas estações (Fevereiro a Setembro), verifica-se que a precipitação em Setúbal é muito superior do que em Alcácer do Sal. Na estação de Setúbal registaram-se 422,20 e 381,6 mm e na estação de Alcácer do Sal registaram-se 340,10 e 269,30 mm, respectivamente em 2010 e 2011, entre Fevereiro e Setembro. A análise dos meses secos corrobora esta ideia, visto que Setúbal apresenta menos meses secos (4 meses contra 5 meses de Alcácer do Sal).

Devido à possível existência de microclimas nos locais de estudo, bem como à influencia da radiação directa sobre as árvores, que aumenta a própria temperaturas dentro das mesmas, poderão existir variações de temperatura entre as estações meteorológicas e os próprios locais em análise, sendo que os dados acima referidos servem de referência, não reflectindo os valores exactos dos respectivos locais.

1.2.3. Caracterização dos pinhais

Para analisar a vitalidade dos diferentes pinhais fez-se uma avaliação da estrutura e densidade dos mesmos. Para tal utilizou-se o método das parcelas, estabelecendo-se três parcelas de 1000m² (50mx20m) por cada local de estudo, coincidentes com o local das armadilhas colocadas no ano anterior. Em cada parcela foram contabilizados todos os pinheiros presentes e foram efectuadas medições de diâmetro à altura do peito (DAP). A estrutura do pinhal foi avaliada através da avaliação da altura total e altura fotossintética e o levantamento das espécies arbustivas dominantes no sub-bosque. Fez-se ainda, em cada local de estudo, a contabilização do número de árvores mortas e com sintomas da doença do nemátode da madeira do pinheiro, com base no número de agulhas amarelecidas ou mesmo ausência de agulhas. Estas medições foram efectuadas no campo entre os meses de Julho e Agosto de 2011.

As medições do diâmetro à altura do peito (DAP) foram efectuadas a uma distância média de 1,3 m acima do solo com recurso à fita métrica. A altura total da árvore e altura fotossintética foram efectuadas com o hipsómetro de Blume-Leiss. A área basal (AB) foi posteriormente calculada a partir dos valores de DAP obtidos, aproximando-se a sua forma à área do círculo ($AB=\pi r^2$, onde $r = \text{raio} = \text{DAP}/2$).

A densidade (nº de pinheiros/ha) foi calculada a partir do número total de árvores vivas presentes em cada parcela. Das árvores mortas, uma vez que estas estavam ainda de pé, foi possível tirar medidas de DAP. Relativamente às árvores cortadas, efectuaram-se medições do diâmetro basal através dos toros que restaram destas.

O estudo da vitalidade foi efectuado com base na percentagem de agulhas amarelecidas e de acordo com o vigor da copa das árvores. Sendo o amarelecimento das agulhas, um dos sintomas do NMP, a sua quantificação é uma forma de analisar a vitalidade da árvore, pois quanto maior for o número de agulhas amarelecidas, menor será a sua vitalidade. Para tal foi seguida uma escala de sintomatologia que utiliza seis estádios de vitalidade com base em diferentes graus de amarelecimento e descoloração das agulhas, de acordo com Proença et al., 2010 (fig. 5):

Estádio 0 – corresponde a árvores saudáveis, sem sintomas;

Estádio I – corresponde aos primeiros sintomas, menos de 10% das agulhas ficam verde-pálido;

Estádio II – 10 a 50% das agulhas apresentam sintomas, com cor vermelho-acastanhado ;

Estádio III – 50 a 80% das agulhas ficam vermelho-acastanhado;

Estádio IV – 100% das agulhas com cor vermelho-acastanhado;

Estádio V – árvore morta, sem agulhas.



Figura 5. Escala de sintomatologia – representação visual correspondente a cada estágio (Proença et al, 2010)

A identificação das espécies arbustivas dominantes foi efectuada com o auxílio de manuais de campo, tais como Flora Ibérica (Castroviejo et al., 2011) e Nova Flora de Portugal (Franco e Afonso, 1984), tendo em conta espécies com maior de representatividade em cada parcela.

1.2.4. Avaliação do potencial infeccioso do insecto

O potencial infeccioso do insecto, *Monochamus galloprovincialis*, foi avaliado com base no número de insectos detectados em cada área, pois quanto maior for a sua presença, maior será a probabilidade de se encontrar árvores infectadas com *Bursaphelenchus xylophilus*. De facto verifica-se uma relação positiva entre a densidade de insectos e a incidência da doença da murchidão do pinheiro (Togashi, 1989).

Para avaliar a densidade do insecto vector, nos diferentes locais de estudo, colocaram-se armadilhas de voo multi-funil, durante dois anos consecutivos, coincidentes com o período de emergência do insecto, que decorre por norma entre Maio e Setembro (Naves et al., 2008). Estas armadilhas são constituídas por 12 funis de plástico preto, sobrepostos, com um frasco colector de plástico branco na extremidade inferior, onde fica retido o material capturado (fig.6).

No primeiro ano, em 2010, as armadilhas estiveram no campo desde 4 de Agosto a 3 de Novembro, todas com os atractivos alfa-pineno, ipsenol e metil butenol, colocados separadamente na armadilha, em invólucros plásticos, como se pode ver na fig.6. (A armadilha da figura não contém ainda metil butenol, pois foi acrescentado só ao depois da 1ª colheita de material). As armadilhas foram colocadas nos pinheiros bravos a 1,8 metros de altura do solo, com uma distância de 3 Km entre si, dentro de cada local. Foram colocadas 5 armadilhas em Pinheiro da Cruz, 4 na Herdade da Apostiças e 3 em

Pinhal das Freiras. A recolha do material capturado foi efectuada com uma periodicidade de aproximadamente 15 dias, e quantificado o número de indivíduos de *Monochamus galloprovincialis*, com identificação quanto ao sexo de cada indivíduo. Esta identificação é efectuada com base no dimorfismo sexual evidenciado pelo tamanho das antenas, que nos cerambicídeos em geral, é maior nos machos do que nas fêmeas (Wang, 2002). A figura A1, em anexo apresenta alguns exemplares de *M. galloprovincialis* capturados.



Figura 6. Exemplificação da colocação das armadilhas multi-funil no campo, com atractivos (alfa-pineno - tira plástica azul; ipsenol -invólucro branco).

Em 2011 foi utilizado o mesmo tipo de armadilhas, contudo estas foram colocadas a uma altura superior à de 2010 a cerca de 2 a 3 metros. As armadilhas foram iscadas com atractivos diferentes em cada local. Em Pinhal das Freiras e na Herdade da Apostiça colocaram-se duas e quatro armadilhas, respectivamente, mantendo-se os atractivos já utilizados no ano anterior (2010). Em Pinheiro da Cruz colocaram-se sete armadilhas, sendo o metil butenol substituído por galloprotec. Esta alteração de atractivo, já justificada anteriormente, provocou alteração na metodologia utilizada nos dois anos, inviabilizando assim a possibilidade de comparar condições ambientais entre os dois anos, em particular em Pinheiro da Cruz, comprometendo o objectivo desta tarefa.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Avaliação do estado de vitalidade dos pinhais de *Pinus pinaster*

Tal como já foi mencionado, a estrutura foi analisada de acordo com a altura total das árvores e a respectiva altura fotossintética, tendo em conta o número total de indivíduos em cada local. A Tabela I apresenta os valores das medições efectuadas em cada parcela, de forma comparativa entre parcelas e entre os três locais de estudo: Pinheiro da Cruz (PC), Pinhal das Freiras (PF) e Herdade da Apostiça (HA).

De acordo com os dados da Tabela I, verifica-se que a herdade da Apostiça apresenta árvores de maior porte (maior altura e maior DAP) e consequentemente com maior altura fotossintética. Já Pinhal das Freiras, dos três locais em estudo é o que apresenta pinheiros com menores dimensões tanto em altura como em DAP, o que evidencia um povoamento mais recente.

Tendo em conta os valores do desvio padrão, da altura das árvores, verifica-se que em PC a parcela PC2 é a que apresenta uma estrutura mais homogénea. Em PF, a parcela PF5 apresenta estrutura mais idêntica entre si, em oposição à parcela PF4, com uma maior desvio padrão e por isso maior heterogeneidade entre os seus indivíduos. Na herdade da Apostiça a parcela HA8 é a mais homogénea. Desta forma verifica-se que quanto maior for o desvio padrão das alturas, mais heterogénea é a estrutura dentro de cada parcela.

Pinhal das Freiras (PF) apresenta a maior densidade de pinheiros por hectare (553) não se verificando qualquer corte de pinheiros nem pinheiros mortos ou com sintomas. Das três parcelas de PF destaca-se PF5, com uma densidade de 920 indivíduos por hectare. Estes resultados levam-nos a concluir tratar-se de um pinhal mais jovem, considerando não só o menor porte dos pinheiros como também a sua maior densidade e ainda ausência de cortes. Em Pinheiro da Cruz a densidade média é de 300 indivíduos por hectare, existindo em média cerca de 26,5% de árvores cortadas e todas as parcelas apresentaram árvores com sintomas. Na Herdade da Apostiça (HA) a densidade média das parcelas é a mais baixa dos três locais em estudo, com 173 indivíduos por hectare, no entanto é o local onde a percentagem de árvores cortadas é maior. Verifica-se nas parcelas de HA a inexistência de árvores com sintomas e um escasso número de árvores mortas (apenas 2 em HA7), mas uma elevada percentagem de árvores cortadas, em média cerca de 58% do número total avaliado. Deste valor não foi possível aferir qual a percentagem de cortes efectuados devido a medidas fitossanitárias nem de cortes para venda, visto que para além dos cortes fitossanitários efectuados no final da época de voo do insecto vector, ao longo do ano são também efectuados cortes para venda de lenha.

A estrutura do sub-bosque em cada local de estudo foi avaliada através das espécies dominantes, da existência de regeneração de *Pinus pinaster* e da percentagem do coberto vegetal em cada local (Tabela II).

Destaca-se a regeneração de *Pinus pinaster* e a existência do tojo (*Ulex australis*) em todas as parcelas, nos três locais de estudo. É também evidente a existência das *Ericaceas* (*Erica australis* e *Caluna vulgaris*), das *Lamiaceas* (*Rosmarinus officinalis* e *Lavandula stoechas*), especialmente em PC e HA, das *Cistaceas* (*Halimium halimifolium*, *Halimium commutatum* e *Cistus salvifolius*). Tal como acontece na estrutura de *P. pinaster*, a estrutura do sub-bosque é, em geral, mais densa nas parcelas de Pinhal das Freiras que nas restantes parcelas, com valores acima dos 70 % de coberto vegetal em todas as parcelas.

A avaliação da vitalidade dos pinhais de *Pinus pinaster* nos três locais de estudo, de acordo com a escala de sintomatologia encontra-se representada na fig. 7. Verifica-se que o local que apresenta maior vitalidade é Pinhal das Freiras, pois não tem nenhum indivíduo infectado ou morto, apesar da maior densidade apresentada nas parcelas deste local. Pinheiro da Cruz é o local com um índice de vitalidade mais baixo, pois é o local que apresenta maior número de árvores mortas e com sintomas. Destaca-se a parcela PC1, que num total de 100 indivíduos, apresenta 57 árvores vivas, 42 árvores mortas e 51 árvores com sintomas, contendo apenas 6 indivíduos que não apresentam qualquer sintoma. Na Herdade da Apostiça apenas a parcela HA7 apresenta uma vitalidade inferior, pois existem 2 árvores mortas com sintomas de nemátode. Nas restantes parcelas não existe qualquer árvores morta ou com sintomas.

Tabela I – Estrutura dos pinhais de *Pinus pinaster*, dos locais de estudo. PC – Pinheiro da Cruz, PF – Pinhal das Freiras e HA – Herdade da Apostiça, cada uma representada por 3 parcelas.

	Nº árvores/ parcela						Valor médio (m)			Valor médio (cm)			Valores/ha		Densidade média (nº/ha)
Parcela	Total	Vivas	Cortadas		Mortas	Com sintomas	Altura da árvore	Desvio padrão	Altura fotossintética	DAP	DAP árv. Morta	Diametro basal árv. cortadas	Área basal (m²/ha)	Densidade (nº/ha)	
			Uni.	%											
PC1	100	57	1	1	42	51	11,50	± 3,04	3,80	14,98	15,23	20,00	10,05	570	300
PC2	43	27	15	34,9	1	10	11,52	± 1,37	2,88	16,69	12,00	24,00	5,91	270	
PC3	16	6	7	43,8	3	3	14,17	± 4,36	5,10	26,17	23,66	31,71	3,23	60	
PF4	24	24	0	0	0	0	8,26	± 4,91	4,13	14,87	NA	NA	4,17	240	553
PF5	92	92	0	0	0	0	8,26	± 1,81	3,14	18,44	NA	NA	24,57	920	
PF6	50	50	0	0	0	0	10,16	± 2,08	7,90	20,30	NA	NA	16,18	500	
HA7	47	26	19	67,9	2	0	18,19	± 3,03	4,66	27,30	33,00	33,53	15,22	260	173
HA8	17	7	10	58,8	0	0	18,14	± 2,34	5,06	26,69	NA	10,76	3,92	70	
HA9	36	19	17	47,2	0	0	20,00	± 2,83	6,67	14,32	NA	40,00	3,06	190	

Tabela II. Espécies dominantes, regeneração de *P. pinaster* e percentagem do coberto vegetal, nas parcelas dos três locais em estudo. (X) – presença e (-) – ausência.

	Pinheiro da Cruz			Pinhal das Freiras			Herdade da Apostiga		
	PC1	PC2	PC3	PF4	PF5	PF6	HA7	HA8	HA9
<i>Caluna vulgaris</i>	X	-	-	-	X	-	-	-	X
<i>Carpobrotus edulis</i>	-	-	-	X	-	-	-	X	-
<i>Cistus salvifolius</i>	-	-	-	X	-	-	-	X	X
<i>Corema album</i>	-	X	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erica australis</i>	X	X	-	X	-	X	-	X	-
<i>Genista tricanthos</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-
<i>Halimium commutatum</i>	-	-	-	-	-	-	X	-	-
<i>Halimium halimifolium</i>	X	X	X	-	-	X	X	X	-
<i>Helichrysum stoechas</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	-
<i>Juniperus oxycedrus</i>	X	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Lavandula stoechas</i>	X	-	X	X	-	-	X	X	-
<i>Lithodora prostrata</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pteridium aquilinum</i>	-	-	-	-	X	-	-	-	-
<i>Rosmarinus officinalis</i>	X	X	X	-	-	-	-	-	-
<i>Stipas gigantea</i>	-	-	-	-	-	X	X	-	-
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>Ulex australis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Regeneração de <i>Pinus pinaster</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coberto vegetal (%)	20-30	60	70	75	90	80	50	30	25-30

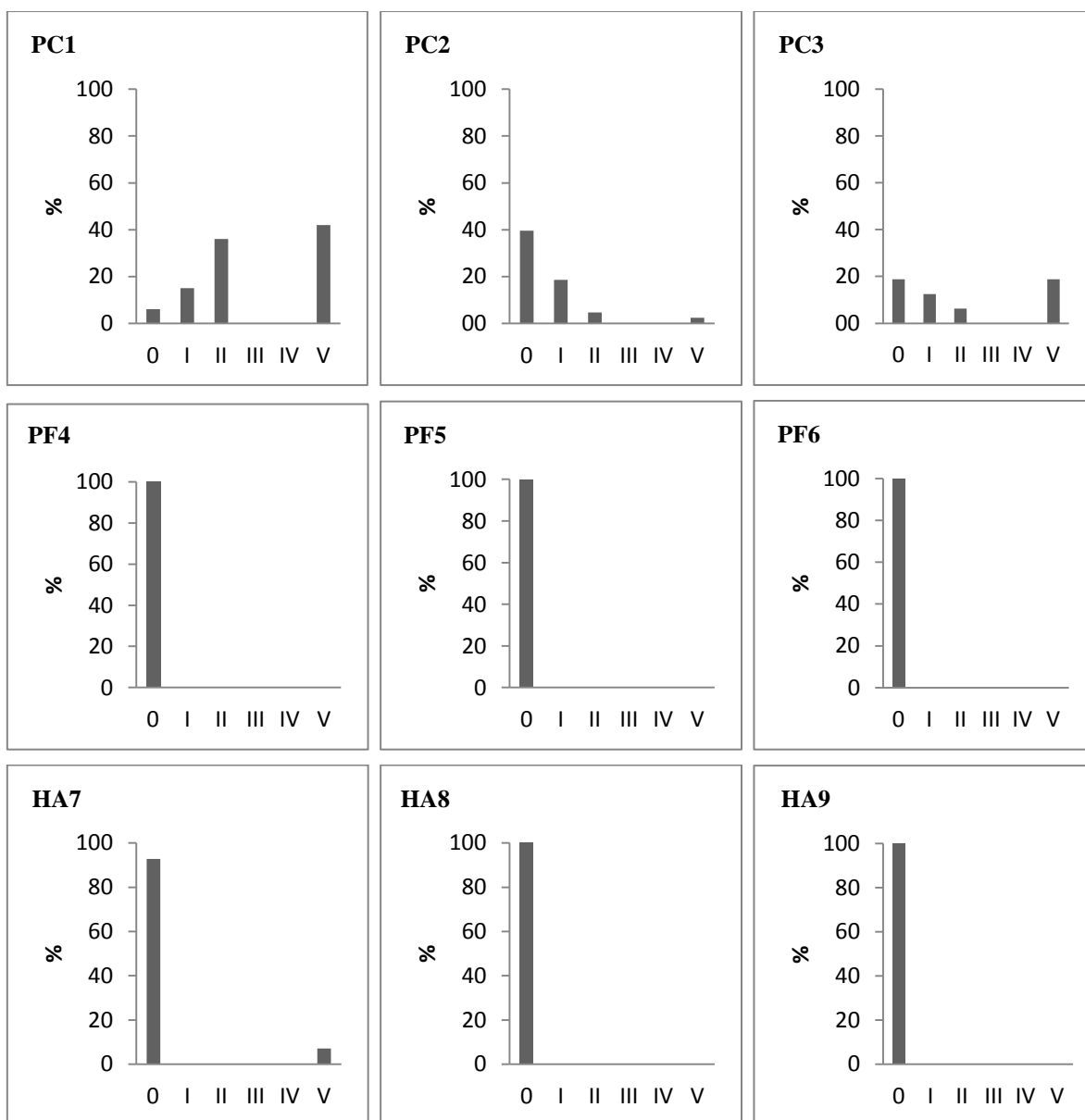


Figura 7. Representação da vitalidade dos pinhais de *Pinus pinaster*, com base na escala de sintomatologia (ver Fig. 5). PC1, PC2 e PC3 parcelas 1, 2 e 3 de Pinheiro da Cruz; PF4, PF5 e PF6 parcelas 4, 5 e 6 de Pinhal das Freias; HA7, HA 8 e HA 9 parcelas 7, 8 e 9 de Herdade da Apostiça.

1.3.2. Avaliação do potencial infeccioso do insecto vector

Os valores de captura de insectos, obtidos com a colocação de armadilhas de voo, no campo em dois anos consecutivos (2010 e 2011), permitiu verificar a existência de uma grande variabilidade entre anos de estudo e entre locais (Figuras 8 A e B).

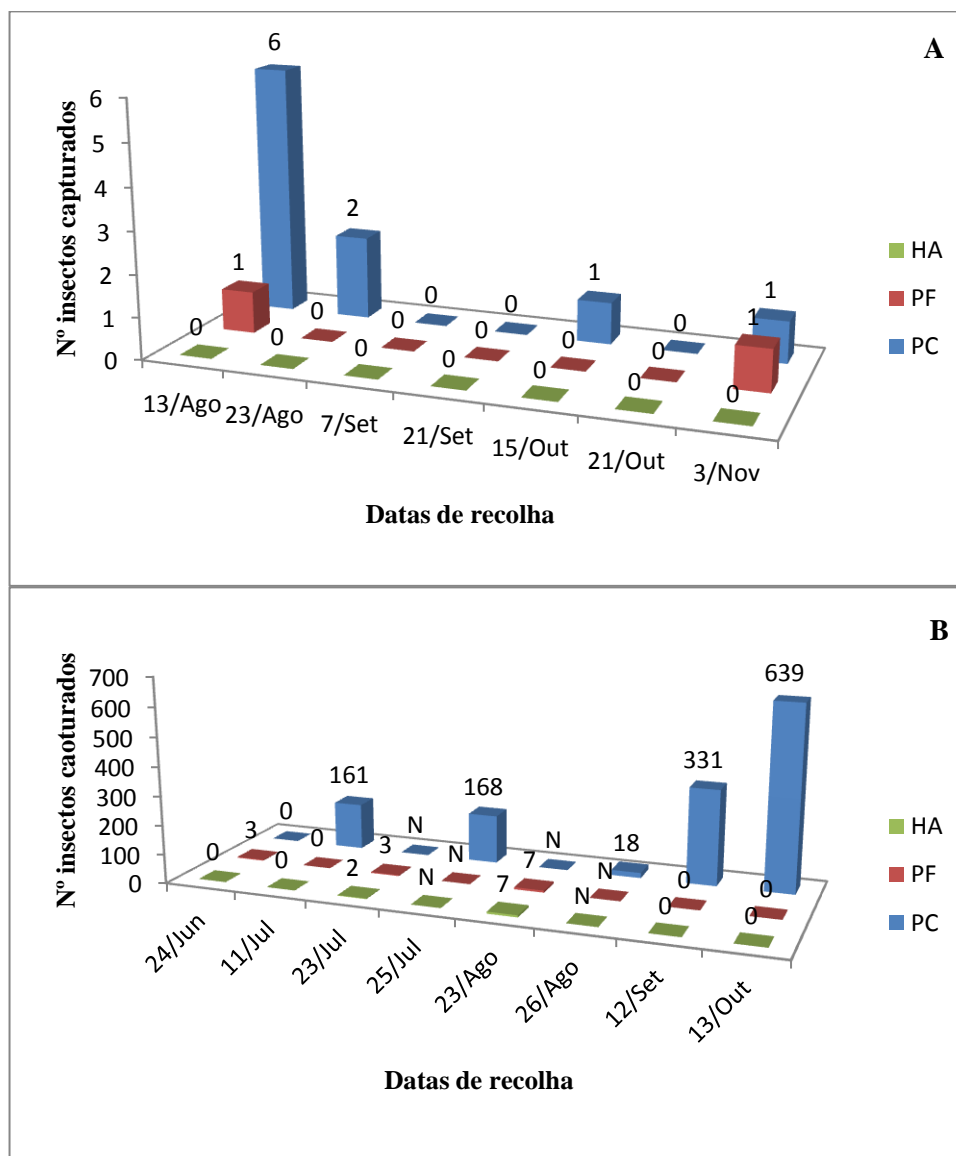


Figura 8. Representação do número de insectos (*Monochamus galloprovincialis*), capturados nos três locais de estudo, Pinheiro da Cruz (PC), Pinhal das Freiras (PF) e Herdade da Apostiça (HA). A – capturas efectuadas em 2010; B – capturas efectuadas em 2011, onde N representa a não recolha nos locais e datas assinalados.

Com a colocação das doze armadilhas nos três meses de 2010 (de Agosto a Novembro), obteve-se um total de 12 insectos, dos quais 10 foram capturados em Pinheiro da Cruz, 2 em Pinhal das Freiras e na Herdade da Apostiça não se apanhou qualquer exemplar. O maior número de capturas foi efectuado em Agosto, com oito em PC e uma em PF, verificando-se ainda capturas no início de Novembro. Desta forma verifica-se um maior potencial infeccioso em Pinheiro da Cruz, por apresentar o maior número de insectos capturados.

Em 2011, as armadilhas estiveram mais um mês no campo, entre Junho e Outubro. Com a colocação das 13 armadilhas nos três locais, obteve-se um total de 1339 insectos. O maior número de capturas obtido foi mais uma vez em Pinheiro da Cruz, com um total de 1317 indivíduos, seguido de Pinhal das Freiras com 13 e Herdade da Apostiça com 9. Ao contrário do ano anterior, foi no final da campanha que se obteve maior número de capturas, em Setembro 331 e em Outubro 639, ambas em PC. De novo a Herdade da Apostiça apresenta o menor número de capturas. Pinhal das Freiras apesar de ter menos uma armadilha que no ano anterior aumentou o número de efectivos capturados. Mais uma vez o potencial infeccioso é maior em Pinheiro da Cruz, com um número bastante superior de capturas.

A discrepância entre os valores obtidos nos dois anos deve-se especialmente ao tipo de atractivo utilizado. Estas alterações tiveram lugar em Pinheiro da Cruz, que para além de mais duas armadilhas comparativamente ao ano de 2010, em 2011 o atractivo 2-metil-3-buten-2-ol foi substituído por 2-undecyloxy-1-etanol. Desta forma comprova-se a eficácia deste último composto, já testada por Pajares et al., (2010), verificando-se com estes resultados um aumento de 131% nas capturas em Pinheiro da Cruz. Também é de ter em conta o facto de as armadilhas terem permanecido no campo mais tempo, pois em 2011 foram colocadas mais cedo, verificando-se um elevado número de capturas logo no mês de Julho. Outro factor a ter em conta é a altura da colocação das armadilhas, que também variou face a 2010, estando em 2011 a uma altura superior, podendo interferir com a altura de voo do insecto.

O conjunto de factores apontados anteriormente dificulta a discussão dos resultados relativamente aos dados climáticos. Isto porque, qualquer variação no número de insectos capturados pode ser justificado pela alteração do atractivo em Pinheiro da Cruz, impossibilitando assim a análise do efeito da variação de temperatura e precipitação entre os dois anos em estudo.

Analizando separadamente os dados obtidos em Pinhal das Freiras e Herdade da Apostiça, onde o atractivo se manteve durante os dois anos, comparando os meses comuns de capturas e de dados meteorológicos (Agosto e Setembro), verifica-se um maior número de capturas em 2011. Verificam-se condições de temperatura e precipitação superiores em 2010, quando comparados com os valores de 2011 (média dos meses referidos: temperatura média 22,7°C e precipitação 3,25mm, em 2010 e temperatura média 21,8°C e precipitação 0,3mm, em 2011). Contudo estas diferenças não são muito relevantes entre os dois anos. Estes resultados demonstram-se insuficientes para avaliar o potencial efeito das condições

ambientais, pois seriam necessárias mais medições para o fazer. Nesta análise é de ter em conta que a altura média de colocação das armadilhas também variou nestes locais. Estes resultados induzem que o maior número de capturas pode estar relacionado com a altura média de colocação das armadilhas, que foi no ano de 2011 mais próxima da altura de voo do insecto.

1.4. CONCLUSÃO

Das medições e amostragens efectuadas verificam-se diferenças significativas entre os três locais de estudo, não só quanto à estrutura, mas também relativamente à vitalidade e gestão dos pinhais. Pode assim concluir-se que a maior vitalidade está relacionada, em cada um dos locais, com o maior número de cortes efectuados, sejam eles fitossanitário ou não, evitando focos de propagação para árvores saudáveis ou árvores susceptíveis. Esta maior vitalidade está associada ao menor número de focos de infecção e menor número de árvores mortas.

Este trabalho contou com algumas restrições operacionais no que respeita à colocação de armadilhas no campo, condicionando o período de estudo, que deveria nos dois anos ser coincidente entre si, e coincidir no mínimo, com o período previsto de emergência do insecto vector. Devendo este período, para uma análise mais correcta, ser alargado anterior e posteriormente a essa época, de forma a identificar possíveis alterações ao período de tempo conhecido como época de emergência e relaciona-lo com as condições ambientais ocorridas.

Devido às diferentes condições de capturas utilizadas nos dois anos em estudo e nos três locais, em especial a utilização de diferentes atractivos, não é possível concluir se as diferenças dos resultados foram provocadas pelas variações de temperatura entre os dois anos. Existe assim uma lacuna, pois se se tivesse mantido o atractivo nos dois anos e nos três locais de estudo, seria possível comparar os locais e seria também possível analisar o eventual efeito das condições ambientais, em particular temperatura e precipitação. Também a escassez de dados torna difícil tirar qualquer conclusão relativamente às condições ambientais, pois existem apenas dois meses de capturas comuns entre os dois anos, com dados meteorológicos.

Apontadas algumas restrições e lacunas deste estudo, os resultados sugerem que são necessários mais estudos pormenorizados face a factores abióticos, tais como temperatura, precipitação e mesmo humidade relativa do ar, que não foi tida em conta neste trabalho, para poder confirmar se alterações climáticas futuras poderão causar alargamento do período de dispersão do insecto no campo e consequentemente maior contacto com árvores susceptíveis.

CAPÍTULO II

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE FACTORES AMBIENTAIS NO POTENCIAL DE INFECCÃO PELO *Bursaphelenchus xylophilus*, EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *pinus*

2.1. INTRODUÇÃO

Vários estudos têm demonstrado que o sucesso e desenvolvimento do nemátode da madeira do pinheiro (NMP) são afectados por diferentes condições ambientais, tais como o stress hídrico (Suzuki e Kiyohara, 1978) e a temperatura (Dozono e Yoshida, 1974). Kuroda (1991) e Utsuzawa (2005) demonstram que o desenvolvimento da doença ocorre muito rapidamente em condições favoráveis de temperatura elevada, entre os 25-30°C, e de stress hídrico, causando a morte da planta em poucos dias (Polomski, 2008). A temperaturas inferiores a 20°C o nemátode multiplica-se mais lentamente e raramente causa a morte da planta (Rutherford et al, 1992). Já a temperaturas superiores o seu desenvolvimento é mais rápido, a 20°C o nemátode completa o seu ciclo em seis dias e a 30°C só necessita de três dias para o fazer (Mota et al., 2009).

Alguns autores verificaram que o período de incubação da doença é inversamente proporcional à temperatura (Sikoda et al., 1991).

Em espécies de *Pinus* susceptíveis e em condições climáticas favoráveis, os nemátodes multiplicam-se rapidamente, alimentando-se de tecidos da árvore, movendo-se do câmbio para o xilema, causando a morte da planta através do bloqueio da condutância da água através do xilema, processo designado por cavitação (Mota et al., 2009).

Doenças associadas ao xilema induzem stress hídrico no hospedeiro devido ao aumento da resistência ao fluxo de água. Uma resposta comum das plantas ao stress hídrico é a redução da condutividade do fluxo de água desde o solo, até à planta e atmosfera. Parte desta redução é causada pelo aumento da resistência ao fluxo de água no xilema na parte aérea (Zimmermann, 1983, in McElrone et al., 2002). Em espécies de pinheiro um potencial de pressão no xilema entre -3,0MPa e -3,9MPa é responsável pela perda de 50% da condutividade hidráulica (Martinez-Vilalta and Pinol, 2002). Valores de potencial hídrico das agulhas de pinheiro abaixo de -5,0MPa, é assumido como dano irreversível, pois as agulhas deixam de funcionar (Evans et al., in Mota e Vieira, 2008).

A redução do potencial de pressão no xilema coincidente com a diminuição de tensão da água e induz ao aumento da área de embolismo do xilema. Como consequência, o xilema torna-se cada vez mais disfuncional, o potencial de pressão no xilema diminui cada vez mais e geram-se fenómenos de cavitação (formação de bolhas de ar nos tecidos condutores) (Ikeda, 1996). Em pinheiros infectados com nemátode *B. xylophilus* a cavitação ocorre rapidamente num grande número de traqueídeos levando à destruição da via de condução de água (Ikeda, 1996).

Uma vez que os sintomas externos da doença só são detectados numa fase avançada do desenvolvimento da mesma, é importante acompanhar as respostas fisiológicas das plantas como um possível indicador precoce do estado de vitalidade dos pinheiros. O potencial hídrico da folha indica o seu

estado hídrico sendo que o seu gradiente explica os fluxos de água no sistema solo-planta-atmosfera (Bergonci et al., 2000). Mesmo em condições de adequada disponibilidade hídrica existem variações de potencial ao longo do dia, este parâmetro descreve o estado hídrico da planta, pelo que é utilizado comumente em estudo de relações hídricas nas plantas. Se a planta perder água a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, o potencial hídrico foliar diminui, provocando o fecho dos estomas e redução da fotossíntese, pelo que variações no potencial hídrico podem afectar a assimilação de carbono pela planta. Não havendo rehidratação dos tecidos ou na presença de agentes patogénicos, neste caso o nemátode, a produtividade da planta pode ser comprometida, levando à morte da planta. Neste sentido torna-se importante estudar a resposta fisiológica das diferentes espécies de pinheiro para tentar aferir antecipadamente a existência da doença antes dos sintomas visíveis ou para confirmar a sua presença, mesmo quando os sintomas já estejam numa fase avançada. Fukuda et al (1992) relataram que a taxa de fotossíntese, a transpiração e o potencial hídrico foliar diminui em pinheiros inoculados com nemátode. Kwan-Soo Woo et al (2010), sugerem que existe uma tendência detectável da diminuição contínua da assimilação desde a fase inicial da infecção com nemátode, mesmo antes do aparecimento de sintomas exteriores.

O trabalho desenvolvido nesta tarefa teve por objectivo estudar a resposta fisiológica de diferentes espécies de *Pinus*, face ao desenvolvimento da infecção induzida do nemátode, em diferentes condições de temperatura e de disponibilidade hídrica controladas, de modo a identificar os factores ambientais que potenciam o efeito do nemátode no seu hospedeiro.

Nas estufas do DBV (FCUL) foram realizadas experiências de inoculação com nemátode (*Bursaphelenchus xylophilus*) em diferentes espécies de pinheiro, e em condições controladas de humidade, temperatura e condições de escassez hídrica no solo. Utilizaram-se três espécies diferentes de pinheiros, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* e *Pinus radiata*, de acordo com a sua pressuposta susceptibilidade face à doença do nemátode da madeira do pinheiro (NMP) e representatividade em Portugal. *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* são as espécies de *Pinus* mais relevantes em Portugal sendo a primeira a mais afectada pelo NMP. Quanto a *Pinus radiata*, apesar de ter uma representatividade reduzida em Portugal, corresponde a uma das espécies de *Pinus* provenientes do mesmo local de onde é originário o NMP, América do Norte. Em plantas artificialmente inoculadas com *Bursaphelenchus xylophilus* foi testado o potencial de virulência do nemátode em diferentes condições de temperatura e disponibilidade de água. A detecção de sinais precoces na fisiologia das plantas de pinheiro sujeitas à infecção com o nemátode, foi avaliada com regularidade, após a infecção, através de parâmetros relacionados com o vigor das plantas, recorrendo a uma escala de sintomatologia e parâmetros fisiológicos relacionados com as relações hídricas.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Desenho experimental

Foram utilizados pinheiros envasados, provenientes dos viveiros florestais da Herdade da Espirra (Pegões) com cerca de 3 a 4 anos, sendo o volume dos vasos de *Pinus pinaster* de 12,6l, o de *Pinus pinea* 17,2l e o de *Pinus radiata* de 3,6l.

Após medições alométricas (altura da planta, altura fotossintética e diâmetro do tronco na base) de todas as plantas procedeu-se à selecção das mesmas de forma a obter grupos homogéneos em termos de dimensões e vitalidade para cada estufa. Para cada uma das espécies foram utilizadas 40 plantas, 20 para cada temperatura tendo sido transferidas para as estufas em Maio de 2011.

As plantas foram colocadas em estufas a duas temperaturas diferentes (25°C – sector 1 e 30°C – sector 5) e posteriormente foi aplicado um tratamento factorial 2x2, com 2 tratamentos hídricos (plantas sem restrições hídricas e plantas com reduzida disponibilidade hídrica) e 2 tratamentos patogénicos (plantas não infectadas e plantas infectadas com nemátode). Assim, para ambas as temperaturas utilizaram-se 4 tratamentos: não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (tratamento de controlo H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+).

Em suma, com a aplicação dos tratamentos referidos às três espécies de *Pinus* em estudo, obteve-se a seguinte representação experimental: (A) temperatura de 25°C, (B) temperatura de 30°C. Para cada temperatura utilizou-se um grupo de 10 plantas, por cada tratamento hídrico (10 plantas de controlo sem restrições hídricas e 10 sujeitas a restrições hídricas). Cada um destes grupos foi dividido em subgrupos de 5 plantas cada, de acordo com plantas infectadas com nemátode e plantas não infectadas. Deste modo utilizaram-se 20 plantas por espécie, para cada temperatura, num total de 120 plantas em estudo.

Definiu-se um plano de rega inicial (periodicidade e quantidade) respeitando o tratamento hídrico escolhido para cada grupo de plantas e de acordo com o volume dos vasos de cada espécie. Desta forma as plantas sem restrições hídricas foram regadas 3 vezes por semana e as plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica foram regadas 2 vezes por semana. As plantas de *P. pinaster* foram regadas com 1 l e 0,5l respectivamente nas plantas sem restrições hídricas e com restrições. As plantas de *P. pinea* sem restrições hídricas foram regadas com 2l e as plantas de reduzida disponibilidade hídrica com 1l. As plantas de *P. radiata* foram regadas com 0,5l no grupo sem restrições e com 0,25l nas plantas com restrições hídricas. Este plano de rega foi ajustado ao longo do período experimental através do controlo da humidade presente no solo das plantas de cada tratamento. Para tal recorreu-se à medição da humidade

do solo, a fim de ajustar a necessidade de disponibilização de água às plantas e avaliar a quantidade de água consumida pelas mesmas.

As duas estufas estiveram em condições naturais de foto-período e de radiação, visto que não existe nenhum controlo específico quando à exposição solar das mesmas, sendo esta dependente da orientação da estufa e do ensombramento provocado pela vegetação circundante. As condições microclimáticas (temperatura, humidade relativa do ar e radiação) no interior das estufas foram registadas a cada 30 minutos, através de três sensores climáticos instalados em cada estufa (HOBO).

2.2.1.1. Inoculação

A inoculação das plantas das espécies de *Pinus* em estudo ocorreu no dia 8 de Julho, de 2011, com inoculo de *Bursaphelenchus xylophilus* recolhido em *Pinus pinaster* naturalmente infectado, em Alcácer do Sal, produzido nos laboratórios da Universidade de Coimbra. Os nemátodes foram mantidos em *Botrytis cinerea*, cultivados em malte e penicilina, em placas de Petri. A extracção dos nemátodes foi efectuada no dia da inoculação através da lavagem das placas com água destilada, para um filtro. A inoculação foi efectuada com cerca de 6000 nemátodes por planta, em suspensão de 500 µl de água destilada. Para a inoculação, fez-se um golpe com bisturi de aproximadamente 2 cm, a cerca de 20 cm abaixo do primeiro ramo de cada planta. Com a ajuda duma micropipeta introduziu-se a suspensão na ferida ou apenas água destilada, no caso das plantas controle. Depois da inoculação o golpe foi envolvido por algodão humedecido e selado com parafilme (fig. A3 do anexo).

2.2.1.2. Monitorização pós inoculação

Após a inoculação avaliou-se semanalmente os sintomas morfológicos da doença, especialmente a cor das agulhas e a queda das mesmas, através da adaptação da escala de sintomatologia (Fig. 5) e da contagem do número de agulhas de ramos tipo marcados inicialmente. Todo este procedimento foi acompanhado de reportagem fotográfica para posterior comparação.

Estes estudos foram acompanhados de medições da fisiologia das plantas realizadas 2 vezes por semana ao longo do período de estudo, que teve início a 8 de Julho de 2011 e terminou a 20 de Setembro do mesmo ano. Realizaram-se medições de potencial hídrico ao amanhecer, entre as 4:00h e 6:00h (ψ – potencial hídrico de base), com uma câmara de pressão tipo Scholander, (Manofrígido, Lisboa, Portugal) em todas as plantas (uma agulha por árvore), de todos os tratamentos. Pretendeu-se com o potencial hídrico de base avaliar o potencial hídrico do solo e desta forma avaliar a capacidade das plantas de repor a água perdida durante o dia, pelo fluxo de água através do xilema que ocorrerá durante a noite,

permitindo verificar se a presença do nemátode nas diferentes espécies de *Pinus* afecta este fluxo. Após a medição do potencial hídrico, entre as 6:00h e as 7:00h realizaram-se medições de humidade do solo, através dum sensor (sonda Thetraprobe), efectuadas em todas as plantas de todos os tratamentos.

A par das medições de potencial hídrico foram ainda efectuadas medições de trocas gasosas em três árvores por tratamento, de cada espécie, nas duas estufas. As medições foram realizadas entre as 10:00 e as 12:30h, sendo efectuadas duas medições por planta, em agulhas do mesmo ramo, previamente seleccionado, num total de duas agulhas por planta. No final das medições as folhas foram colhidas para determinação da área foliar. Estas medições foram efectuadas através dum sistema de trocas gasosas portátil (GFS-3000, Walz, Effeltrich, Germany), onde as agulhas foram dispostas paralelamente dentro da câmara sujeita a radiação constante (PPFD -photosynthetic photon flux density) de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medições obtidas foram corrigidas com a área real das agulhas utilizadas, obtendo-se para cada tratamento a condutância estomática (gs), a taxa fotossintética (A) e a taxa de transpiração (E).

O final da experiência foi determinado quando todas as plantas de cada tratamento atingiram o último estágio de sintomatologia. Neste caso, o último estágio (V), foi considerado atingido quando todas as agulhas das árvores estavam mortas, mesmo estando algumas delas ainda presas à árvore. Isto porque, devido à ausência de vento nas estufas as agulhas não caíram naturalmente como sucede nos pinhais afectados, verificando-se a sua queda pelo toque ou deslocação dos vasos das árvores.

Após detectada a morte das árvores, as mesmas foram cortadas e separadas nos seus componentes: agulhas, ramos, troncos, raízes e o solo de cada vaso, para posterior análise e avaliação do desenvolvimento da população de *Bursaphelenchus xylophilus*, tendo em conta as condições ambientais e os tratamentos a que foram sujeitos, comparativamente ao número de nemátodes inoculado inicialmente. Este trabalho foi realizado pela equipa da Universidade de Coimbra, pelo que estes dados não serão alvo de discussão no presente trabalho.

2.2.1.3. Análise estatística

Utilizou-se o T- teste, análise paramétrica, para comparar as medições de potencial hídrico, nos diferentes tratamentos. Para a análise do efeito dos tratamentos aplicados utilizou-se um GLM (general linear model). Em qualquer uma das análises, considerou-se o nível de significância ao nível de $p \leq 0,05$.

A análise estatística apresentada foi efectuada com recurso ao programa Statistica package (StatSofts, Inc.).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Caracterização inicial

Através da realização de medidas alométricas de altura total da árvore, altura fotossintética e diâmetro do tronco na base, podem caracterizar-se os pinheiros usados em cada um dos tratamentos em estudo (figura 9 A e B).

Verifica-se a existência de algumas diferenças estruturais entre as três espécies de pinheiro, na estufa dos 25°C. *P. pinaster* é a espécie que tem maior altura média e *P. radiata* a menor. *P. pinea* é a espécie que apresenta maior diâmetro e *P. radiata* menor. Já a altura fotossintética média é idêntica entre *P. pinaster* e *P. pinea*, sendo em *P. radiata* mais reduzida. Dentro de cada espécie a que apresenta árvores menos semelhantes entre si é *P. pinaster*, especialmente no que concerne ao diâmetro, pois é a que apresenta maior desvio padrão.

Como seria de esperar a estrutura das diferentes espécies também varia, na estufa a 30°C. *P. pinaster* apresenta árvores com maior altura média e maior altura fotossintética, seguido de *P. pinea*. Já *P. radiata* destaca-se pelas suas reduzidas dimensões, tanto em altura média e altura fotossintética, como no diâmetro médio do tronco. *P. pinea* tem de novo maior diâmetro do tronco comparativamente às restantes espécies (fig. 9 B).

Comparando as figuras A e B, não se verificam diferenças significativas na estrutura dos pinheiros das duas estufas.

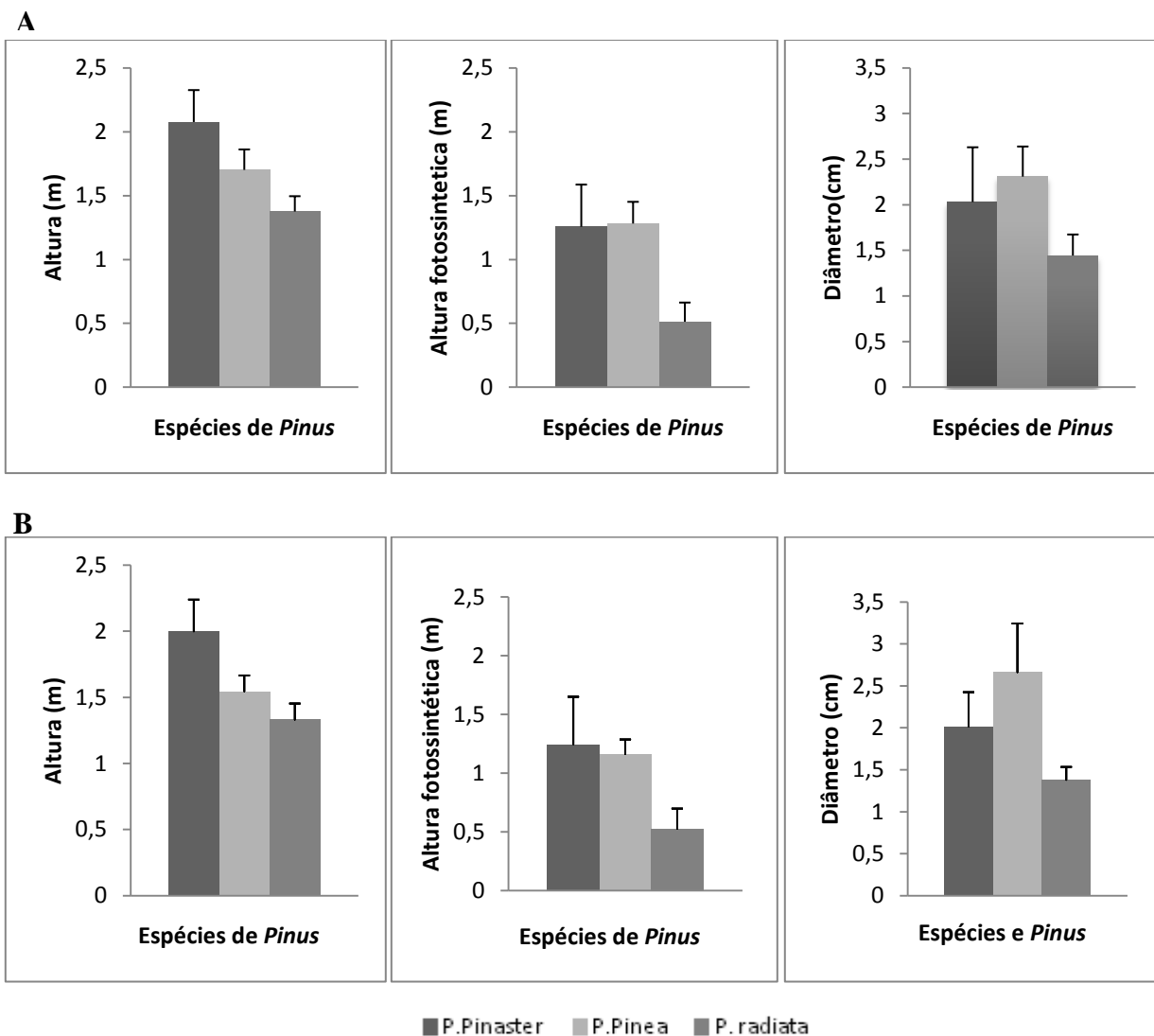


Figura 9. Representação dos valores médios e do desvio padrão da altura, da altura fotossintética e do diâmetro das plantas das espécies em estudo. A – estufa a 25°C. B – estufa a 30°C.

2.3.2. Monitorização das condições ambientais: temperatura, humidade relativa do ar e radiação

As condições ambientais das duas estufas foram monitorizadas ao longo de todo o período experimental, quer antes da inoculação dos pinheiros, quer após a inoculação. Registaram-se os valores máximos, médios e mínimos da temperatura e humidade relativa do ar, e ainda os valores da radiação solar, durante todo o dia (período diurno e nocturno) de modo a garantir que eram mantidas as condições inicialmente estabelecidas.

A fig. 10 apresenta a monitorização das temperaturas máxima, média e mínima do ar, nas estufas de 25°C e 30°C, entre o período de 3 de Julho e 25 de Setembro, de 2011. Verifica-se que na estufa designada 25°C, a média da temperatura máxima foi de 28,68°C, a temperatura média foi de 22,9°C e o valor médio da temperatura mínima foi de 17,80°C. Na estufa designada 30°C a média da temperatura máxima foi de 35,14°C, a média da temperatura média foi de 25,61°C e a média da temperatura mínima foi de 18,47°C. A temperatura máxima (40,13°C) foi atingida no dia 26 de Julho na estufa de 30°C (19º dia após a inoculação).

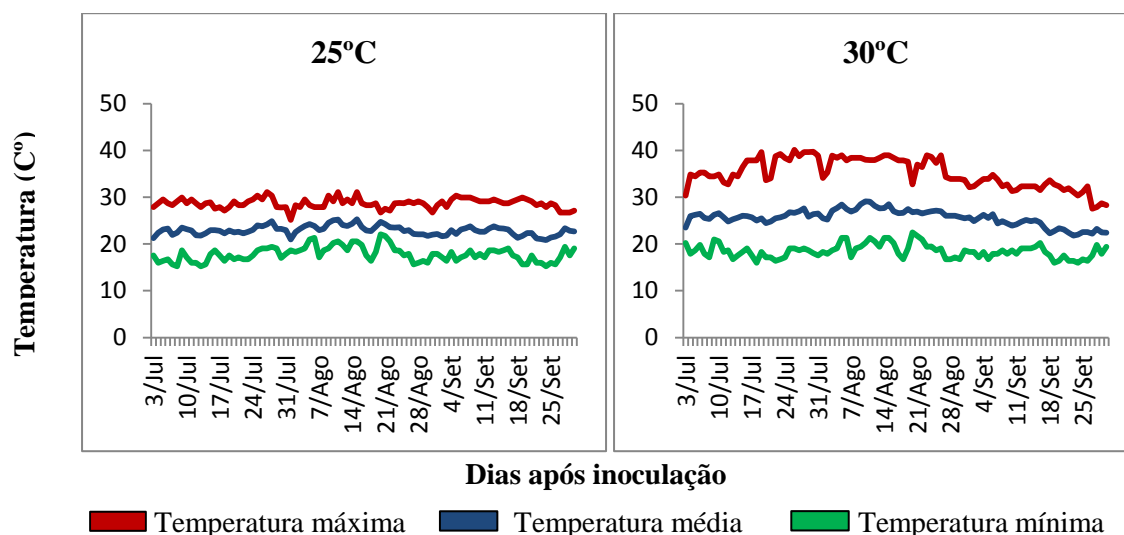


Figura 10. Variação das temperaturas máxima, média e mínimas durante o período experimental, nas estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

Verifica-se que as condições ambientais de temperatura estabelecidas inicialmente para as duas estufas – 25° e 30°C – variaram ao longo de todo o período experimental. Apesar das medidas de controlo da temperatura interna das estufas, estas são influenciadas pela temperatura exterior e pela radiação solar a que cada uma está exposta, factor que varia significativamente entre as duas estufas. Como se pode verificar na fig.12 a radiação foi superior em todo o período experimental na estufa de 30°C comparativamente à estufa de 25°C, devido à exposição de cada estufa e ao ensombramento causado pela vegetação circundante. Assim conseguiram-se temperaturas médias 25,6°C na estufa designada 30°C e de 22,9°C, na estufa de 25°C, obtendo-se uma diferença de temperatura entre as duas estufas de 2,7°C em vez dos 5°C inicialmente estabelecidos. Ainda assim, as temperaturas obtidas ao longo da experiência estão de acordo com a bibliografia no que concerne às temperaturas favoráveis ao desenvolvimento de *B. xylophilus*.

A fig. 11 apresenta os valores máximos, médios e mínimos da humidade relativa do ar, monitorizados nas duas estufas, para o período em estudo. Este parâmetro mede a quantidade de vapor de água existente no ar, relativamente ao máximo que o ar pode conter à mesma temperatura. A humidade relativa varia inversamente à temperatura, sendo que na estufa sujeita a maior temperatura, a humidade relativa é menor. Na estufa dos 25°C, a média dos valores máximos da humidade relativa do ar foi de 72 %, a humidade média foi de 54% e a média da humidade mínima foi de 37%. Na estufa com maior temperatura, a dos 30°C, a humidade relativa do ar máxima teve um valor médio de 66%, a humidade média foi de 48% e a média da humidade mínima foi de 28%. Mais uma vez se verifica que das condições ambientais inicialmente estabelecidas, a humidade relativa do ar também sofreu alterações. Assim apesar de se pretender inicialmente uma humidade relativa do ar de 60% nas duas estufas, obteve-se um valor médio de 54% na estufa de 25°C e de 48% na estufa de 30°C, alcançando uma diferença na ordem dos 6%, entre as duas estufas. Para além das condições ambientais exteriores de temperatura e precipitação, a humidade relativa do ar medida nas estufas, foi afectada pela própria temperatura interna sentida em cada sector, sendo por isso ligeiramente superior na estufa de menor temperatura.

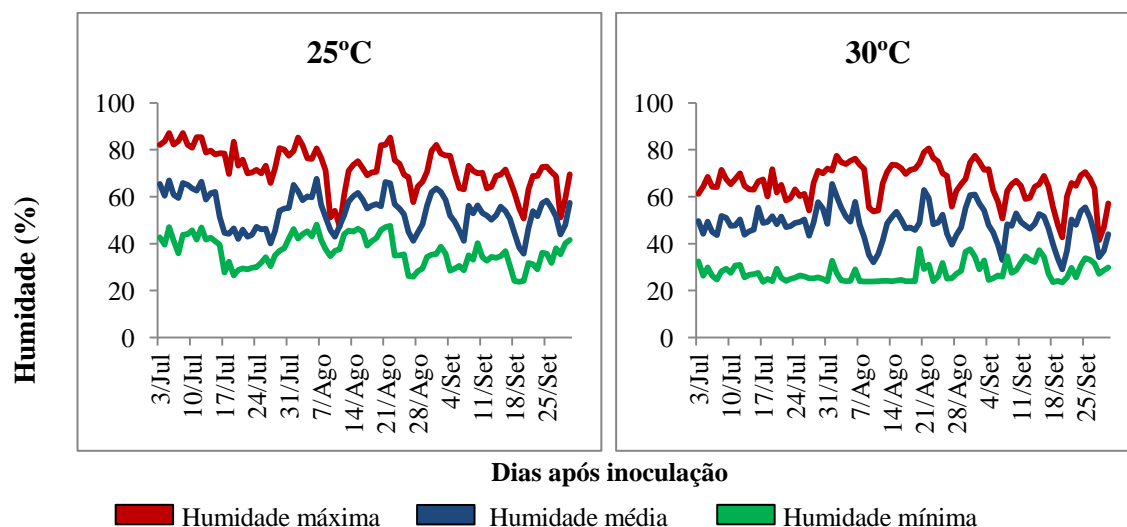


Figura11. Variação da humidade relativa do ar (máxima, média e mínima), para as estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

Na fig.12 estão representados os valores de radiação fotossinteticamente activa (PAR) medidos dentro das estufas, durante o período experimental. Estes valores variaram entre 100 e 315 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com um valor médio de 177 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na estufa designada 25°C. Na estufa de temperaturas mais elevadas a PAR atingiu valores entre 118 e 423 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com um valor médio de 261 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Verificou-se assim uma radiação superior na estufa dos 30°C, o que se explica por ser esta a estufa mais exposta à radiação solar e a menos ensombrada pela vegetação circundante às estufas.

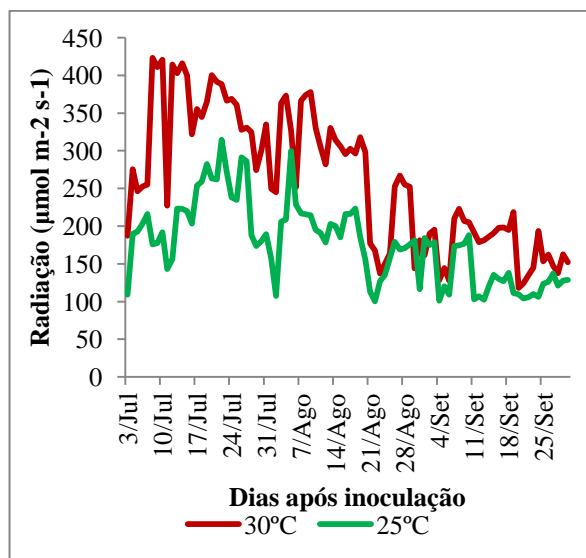


Figura 12. Variação da radiação fotossinteticamente activa (PAR) durante o período experimental, nas estufas da temperatura de 25°C e 30°C.

2.3.3. Monitorização do conteúdo hídrico do solo

A monitorização da humidade do solo foi efectuada através da medição do conteúdo hídrico do solo periodicamente ao longo de toda a experiência, logo após as medições de potencial hídrico (Fig.13).

Como seria de esperar o regime de rega a que se sujeitaram as plantas permitiu obter dois tratamentos hídricos distintos, com alguma diferença entre as espécies de pinheiros e alguma variabilidade associada também a cada espécie.

Em *Pinus pinaster*, em todos os tratamentos de ambas as temperaturas, conseguiu-se manter diferentes valores de humidade do solo, de modo a proporcionar diferente quantidade de água ao grupo de reduzida disponibilidade hídrica e ao grupo controlo, como se pretendia. Desta forma obtiveram-se valores médios de 0,22 m³/m³, nas plantas sem restrições hídricas e de 0,13 m³/m³, nas plantas de reduzida disponibilidade hídrica. É de salientar um decréscimo nos valores de conteúdo hídrico das plantas não infectadas relativamente às infectadas, nos últimos dias, em particular na temperatura de 30°C. Isto deve-se muito provavelmente à diminuição do consumo hídrico por parte das plantas infectadas, demonstrando assim a sua reduzida actividade ou mesmo denunciando a sua morte.

Em *Pinus pinea*, apesar dos valores do conteúdo hídrico do solo serem bastante baixos, devido provavelmente a uma composição mais arenosa destes solos, conseguiu-se ainda assim, tal como se pretendia, obter valores diferentes para estes tratamentos. Nas plantas sem restrições hídricas os valores médios foram de $0,07 \text{ m}^3/\text{m}^3$ e nas plantas de reduzida disponibilidade hídrica os valores foram de $0,02 \text{ m}^3/\text{m}^3$. Verifica-se que esta é aparentemente a espécie sujeita a menor conteúdo de água no solo, contudo não é a espécie mais afectada pela escassez da mesma, o que se confirma pela sintomatologia (Fig. 14). O facto das plantas se terem mantido nos mesmos vasos e com o mesmo solo dos viveiros pode justificar esta diferença, pois o próprio solo entre as plantas das três espécies é relativamente diferente, sendo o solo das plantas de *P.pinea* de textura mais arenosa e portanto com uma menor retenção de água.

Em *Pinus radiata*, os valores de humidade do solo, dentro de cada tratamento foram muito semelhantes nas duas temperaturas. Na estufa de 25°C , nas plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica, verificam-se valores muito reduzidos de humidade do solo, chegando em algumas medições a atingir valores muito próximos de zero (valores do dia 20) (fig. 13 C). Nas plantas sem restrições hídricas os valores médios foram de $0,19 \text{ m}^3/\text{m}^3$ e nas plantas de reduzida disponibilidade hídrica os valores foram de $0,05 \text{ m}^3/\text{m}^3$. Verificam-se diferenças no conteúdo hídrico do solo em *P. radiata*, em especial a 30°C , nas plantas controlo e sem nemátode é inferior à quantidade de água no solo nas plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica. Contudo, essa diferença pode estar relacionada com a morte dos pinheiros sujeitos a baixa disponibilidade hídrica e infectados, pois no dia 43 o seu estado sintomatológico já decretava a morte dos mesmos (vide figura 14), não havendo já consumo de água do solo. Este é um facto que justifica os elevados valores ou a constância de humidade do solo nas últimas medições efectuadas em cada tratamento.

Devido às diferenças dos solos das três espécies de *Pinus* e devido às diferenças de necessidade de água intrínsecas a cada espécie, não foi possível manter teores de humidade do solo idênticos entre as espécies. Verificam-se alguns picos ao longo do período experimental que estão associados a medições da humidade do solo muito próximas a dias de rega dos pinheiros.

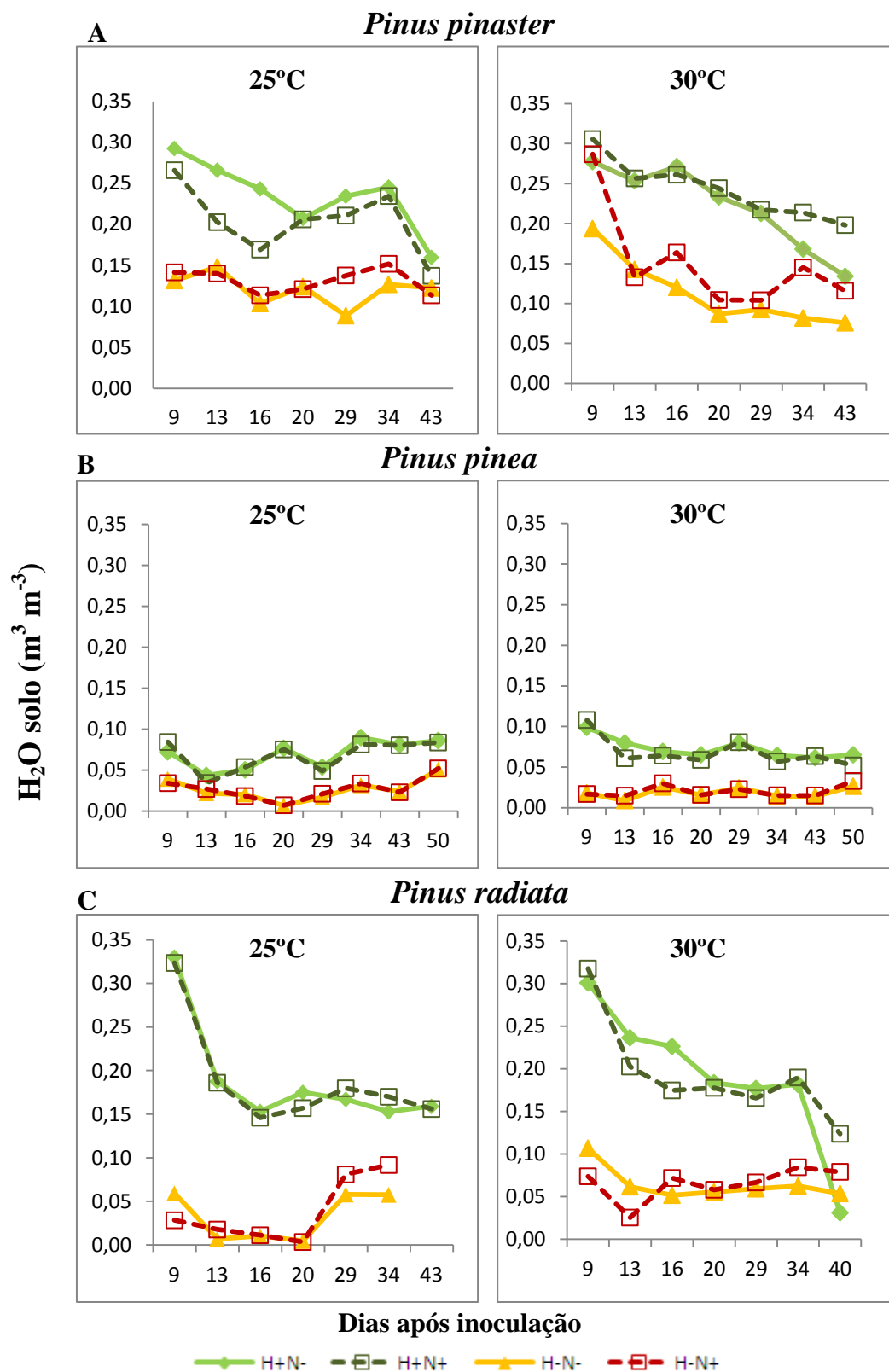


Figura 13. Conteúdo hídrico do solo (m^3/m^3) nos vasos das plantas. A – *P. pinaster*; B – *P. pinea*; C – *P. radiata*, nos dois tratamentos de temperatura (25°C e 30°C).

2.3.4. Desenvolvimento de sintomas (escala sintomatológica)

A Fig. 14 apresenta a resposta sintomatológica das espécies de pinheiro à infecção pelo *Bursaphelenchus xylophilus*, onde cada cor representa um estágio evolutivo da doença. É notório o efeito do nemátode, verificando-se que *P. pinaster* e *P. radiata* são as espécies que apresentam sintomas mais avançados da doença do nemátode da madeira do pinheiro. Observa-se também o efeito da temperatura visto que na temperatura mais elevada, os estádios mais avançados surgem primeiramente. *P. pinea* demonstra-se sem sintomas pois ao longo do período experimental as agulhas não revelaram alteração de cor relevante. Com a contagem do número de nemátodes apenas se registaram nemátodes em 3 plantas de *P. pinea*, no tratamento de stress hídrico, em número reduzido, não se registando em nenhum outro tratamento, ao contrário do que aconteceu com as demais espécies em estudo, onde se verificou um elevado número de nemátodes relativamente ao número inoculado inicialmente (Fonseca et al., 2012).

A tabela III apresenta os últimos estádios da doença atingidos pelas diferentes espécies e a percentagem das plantas que atingiram cada estágio. É evidente a ausência de estádios avançados em *P. pinea*, em contraste com os estádios atingidos em *P. pinaster* e *P. radiata*. Tanto o estágio IV como o V correspondem à morte da planta. A distinção entre os dois estádios foi feita com base na queda das agulhas pelo toque das mesmas, pois devido à inexistência de vento nas estufas, as agulhas não caem naturalmente, como acontece no campo.

Verifica-se que em *P. pinaster* na temperatura de 25°C, o estágio IV foi atingido no dia 34 e na temperatura de 30°C, ocorreu no dia 20, após a inoculação. É de ter em conta que algumas árvores utilizadas no estudo apresentavam já sinais de declínio, que podem estar relacionadas com outros factores não avaliados ao longo do período experimental, como por exemplo a disponibilidade de solo à planta face às dimensões da mesma. Contudo, a análise efectuada à posteriori relativamente à contagem do número de nemátodes presentes em cada planta, demonstram a multiplicação deste, relativamente ao número inicialmente inoculado (Fonseca et al., 2012), evidenciando que o estado final de morte atribuído às plantas esteja efectivamente associado à doença do nemátode da madeira do pinheiro.

Em *P. pinea* foram surgindo alguns sintomas com o passar do tempo, contudo, em 50 dias de observações após a inoculação, o estágio mais avançado registado foi o III (50 a 80% das agulhas apresentavam cor vermelho acastanhado), apenas na temperatura de 30°C.

Em *P. radiata* na temperatura de 25°C, o estágio IV foi atingido ao 43º dia após a inoculação, nas plantas infectas com nemátode sem restrições hídricas e ao 27º dia nas plantas infectas sujeita a reduzida disponibilidade hídrica. Na temperatura de 30°C o mesmo estágio foi atingido mais cedo, ao 34º dia nas plantas infectas sem restrições hídricas e ao 23º dia nas plantas infectadas sujeita a reduzida disponibilidade hídrica.

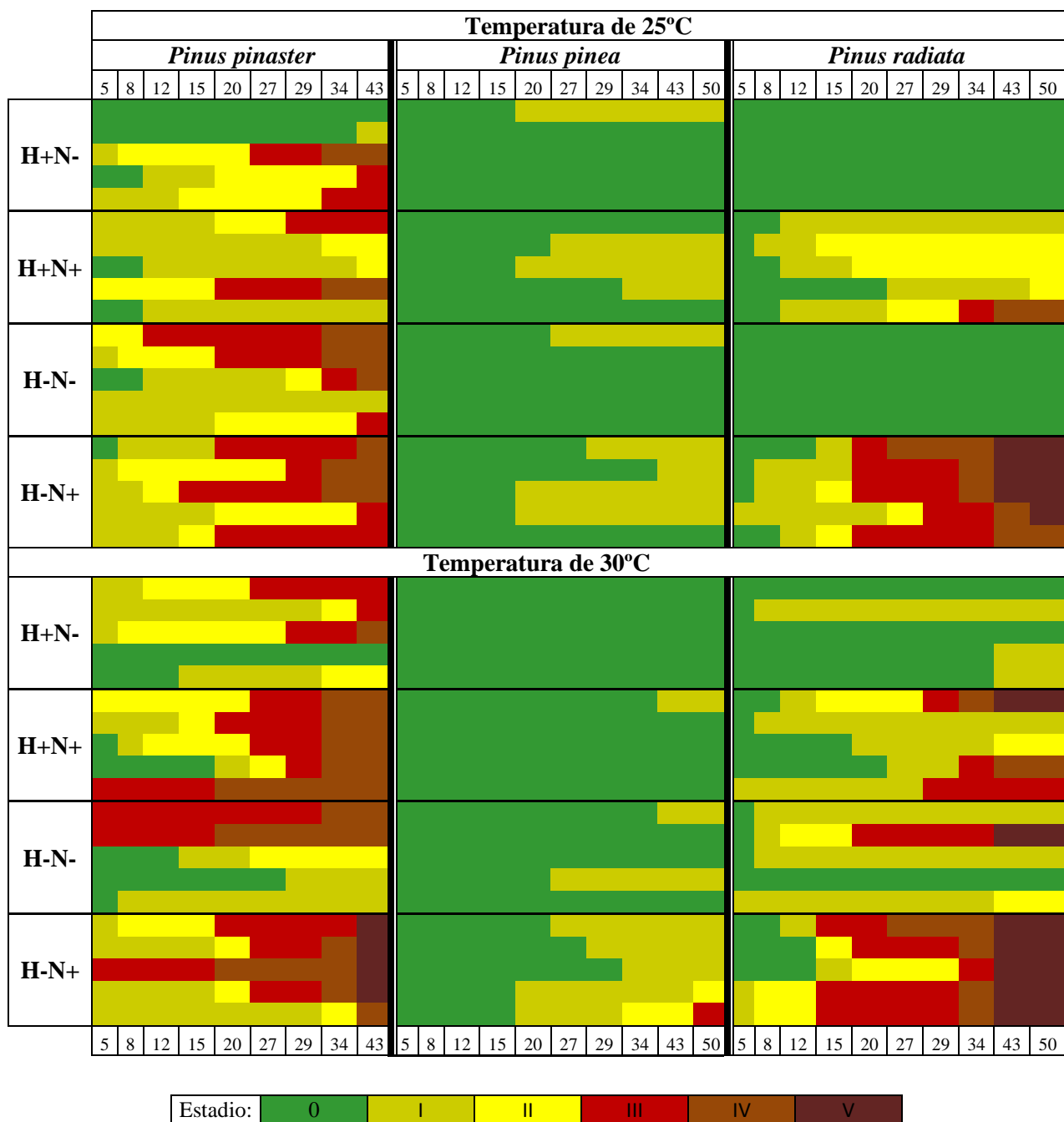


Figura 14. Caracterização do grau de vitalidade dos pinheiros através da escala de sintomatologia em *P. pinaster*, *P. pinea* e *P. radiata*, a 25°C e 30°C, onde: plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+).

Tabela III. Valores em percentagem da mortalidade de cada espécie, em cada tratamento, referentes ao estágio IV e V. Em que: plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+).

		Temperatura de 25°C					
		<i>P.pinaster</i>		<i>P.pinea</i>		<i>P. radiata</i>	
		IV	V	IV	V	IV	V
Tratamentos	H+N-	20	0	0	0	0	0
	H+N+	20	0	0	0	20	0
	H-N-	60	0	0	0	0	0
	H-N+	60	0	0	0	20	80
		Temperatura de 30°C					
		<i>P.pinaster</i>		<i>P.pinea</i>		<i>P. radiata</i>	
		IV	V	IV	V	IV	V
Tratamentos	H+N-	20	0	0	0	0	0
	H+N+	100	0	0	0	20	20
	H-N-	40	0	0	0	0	20
	H-N+	20	80	0	0	0	100

2.3.5. Resposta fisiológica e sintomatológica das espécies de pinheiro ao potencial infeccioso do nemátode

As figuras 15, 16 e 17, demonstram o efeito do potencial infeccioso de *Bursaphelenchus xylophilus*, no potencial hídrico de base, na taxa fotossintética (A), na condutância estomática (gs) e na transpiração (E), em *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* e *Pinus radiata*, respectivamente. Estes quatro parâmetros fisiológicos estão interligados uma vez que uma deficiência de água ao nível das agulhas (baixo potencial hídrico) pode reflectir-se na redução das trocas gasosas, nomeadamente na condutância estomática e consequentemente na transpiração e fotossíntese.

Alguns parâmetros em alguns tratamentos, em especial nas plantas sujeitas a stress hídrico, em *P. pinaster* e *P. radiata*, não apresentam valores nas últimas medições. Isto ocorreu porque a maioria das plantas dos respectivos tratamentos já estavam mortas e por isso não se efectuaram medições. No 13º dia após a inoculação só se realizaram medições de potencial hídrico de base, daí os restantes parâmetros não terem qualquer registo nesse dia.

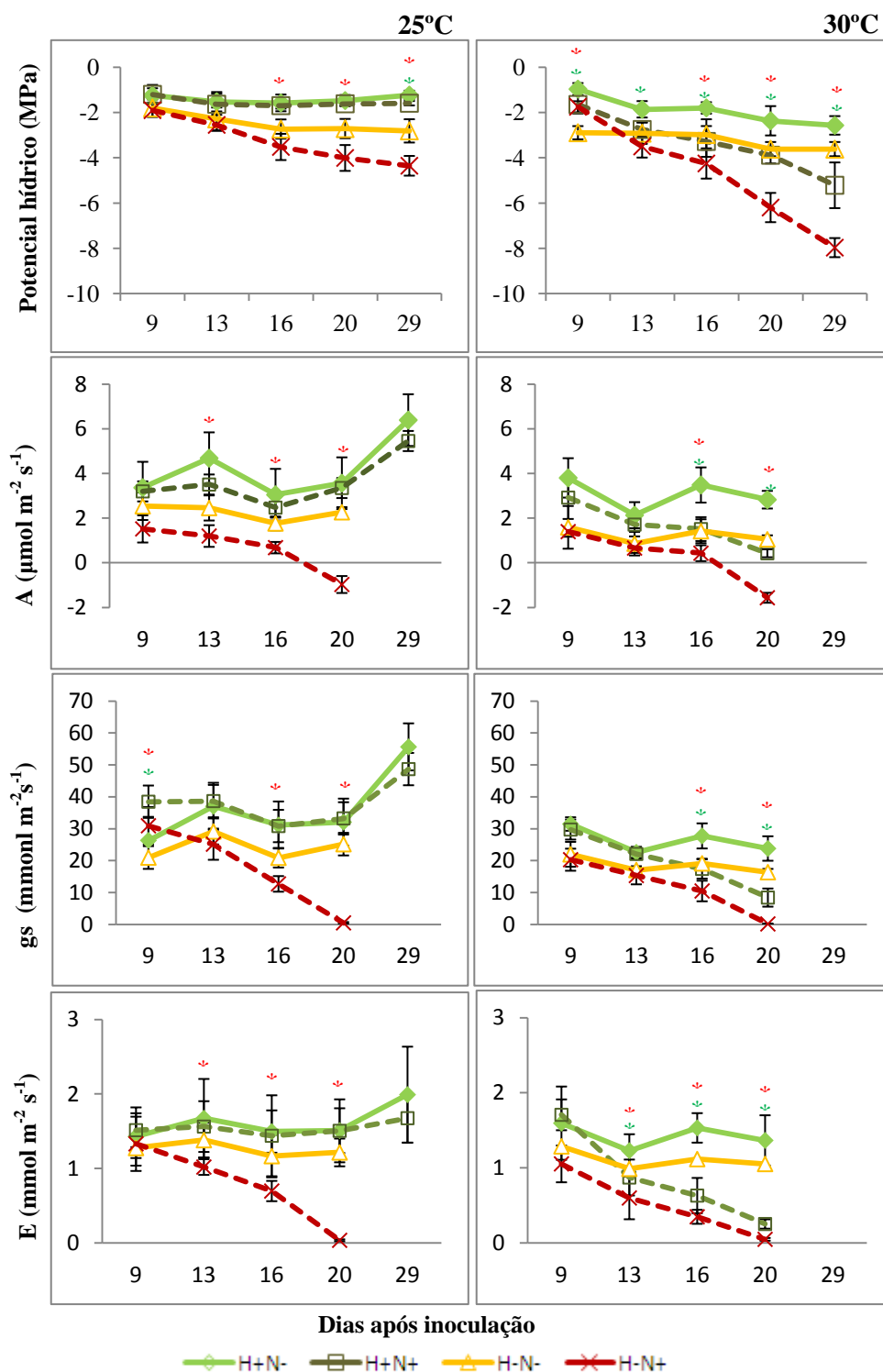


Figura 15. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Taxa de transpiração (E) em *Pinus pinaster*, após a inoculação por nemátodo, para as temperaturas de 25°C e 30°C. Plantas não infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N-); infectadas com elevada disponibilidade hídrica (H+N+); não infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N-); infectadas com baixa disponibilidade hídrica (H-N+). (*) valores significativos entre os tratamentos H+; (*) valores significativos entre os tratamentos H-.

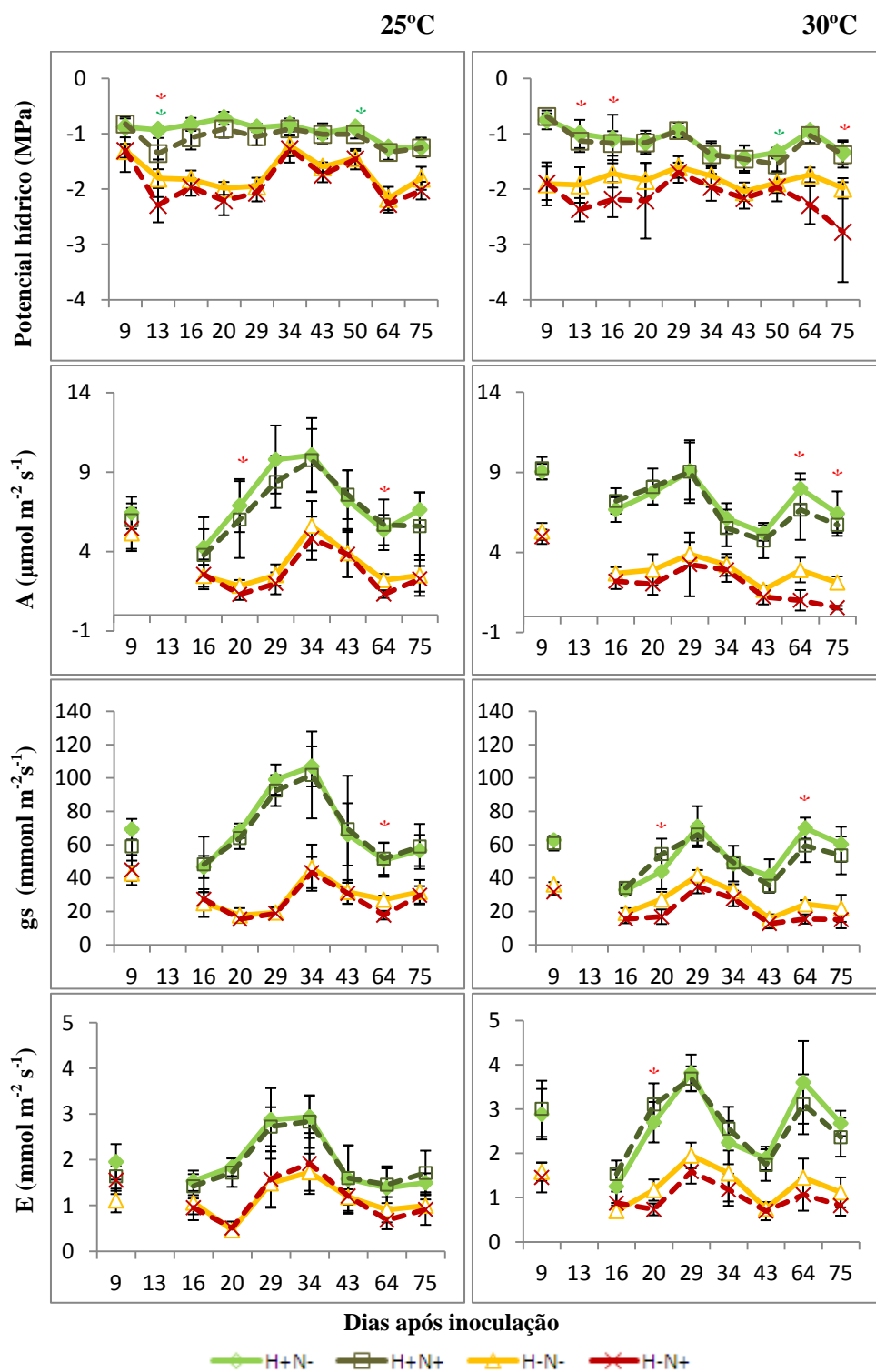


Figura 16. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Transpiração (E) em *Pinus pinea*, após a inoculação com o nemátode, para as temperaturas de 25°C e 30°C.

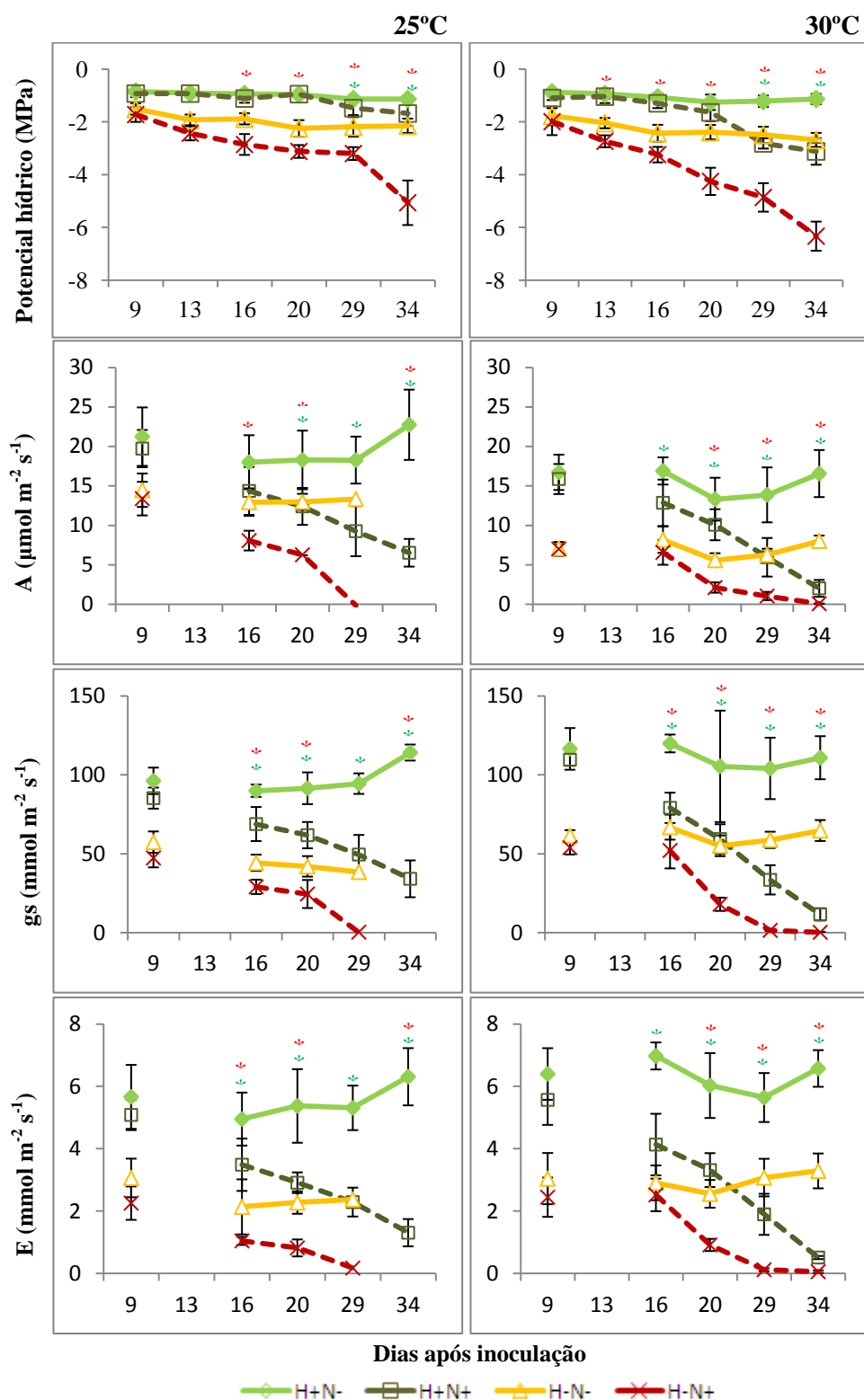


Figura 17. Variação do potencial hídrico de base (ψ), Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (gs) e Transpiração (E) em *Pinus radiata*, durante o período experimental, para as temperaturas de 25°C e 30°C.

Os resultados de potencial hídrico medidos em *P. pinaster* (fig. 15) e *P. radiata* (fig. 17) demonstram uma resposta fisiológica, nas duas temperaturas em estudo, nas plantas infectadas com nemátode, demonstrando uma progressiva diminuição do valor de potencial a partir do 9º dia após a inoculação. No caso das plantas não infectadas, essa diminuição não se verifica. Já em *P. pinea*, em qualquer dos tratamentos hídricos, não se verifica nenhuma resposta fisiológica das plantas infectadas com nemátode, apresentando sempre valores muito semelhantes ao das plantas não infectadas em todos os registos de medição (fig. 16).

Em qualquer das espécies em estudo, como seria de esperar, as plantas em stress hídrico apresentam valores de potencial hídrico mais negativos comparativamente às plantas sem stress, o que está de acordo com a disponibilidade hídrica do solo (fig.13), verificando-se valores de conteúdo hídrico do solo inferiores em cerca de 59%, 29% e 26% nas plantas em stress de *P. pinaster*, *P. pinea* e *P. radiata* respectivamente. Comparando a resposta fisiológica à infecção com nemátode entre os dois tratamentos de temperatura, em *P. pinaster* e *P. radiata*, observam-se valores de potencial hídrico mais negativos na temperatura mais elevada (30º C). Os resultados obtidos revelam que a resposta das plantas sob a temperatura mais elevada acabou por se verificar mais cedo, o que se comprova também pela resposta sintomatológica (fig. 14), pois os sintomas aparecem primeiramente nas plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica e infectadas com o nemátode, nos tratamentos de temperatura mais elevada. Em *P. pinea*, o valor de potencial hídrico é muito idêntico nas duas temperaturas, em especial nas plantas de controlo. Em *P. pinaster*, a 25ºC a diferença de potencial hídrico, entre as plantas controlo e as plantas inoculadas, é significativa a partir do dia 29 após a inoculação, no entanto nas plantas sujeitas a stress hídrico esta diferença torna-se significante mais cedo, ou seja 16 dias após a inoculação (fig.15). Verifica-se na primeira medição efectuada a 30ºC, nos tratamentos com reduzida disponibilidade hídrica, que o valor de potencial hídrico, das plantas com nemátode é superior às plantas sem nemátode, ao contrário do que seria de prever. Facto que pode ser explicado pelo maior conteúdo hídrico do solo nestas plantas (fig.13), só a partir do 13º dia as plantas do tratamento de stress apresentam valores semelhantes de conteúdo hídrico do solo (fig.13).

Desde o início da inoculação até ao final da experiência, em *P. pinaster* e *P. radiata* verificaram-se valores de potencial hídrico cada vez mais negativos nas plantas inoculadas com nemátode. Esta diferença significativa de potencial hídrico face às plantas não inoculadas, em especial na temperatura de 30ºC, evidencia a perda de condutância dos vasos xilémicos em resposta à infecção com o nemátode e como se verifica igualmente no elevado estado sintomatológico das mesmas devido provavelmente à disfuncionalidade das agulhas como é referido por Evans et al (in Mota e Vieira, 2008). Em *P. pinaster* registaram-se valores mínimos de potencial hídrico de -4,36MPa, a 25ºC e de -7,97MPa, a 30ºC, nas plantas inoculadas com nemátode e submetidas a stress. Valores que de acordo com a bibliografia

correspondem a elevada perda na condutividade hidráulica (Martinez-Vilalta and Pinol, 2002) ou mesmo a danos irreversíveis (potencial abaixo de -5,0MPa), como indica Evans et al (in Mota e Vieira, 2008).

Em *P. radiata*, as plantas sob reduzida disponibilidade hídrica apresentaram uma diminuição significativa de potencial hídrico a partir do dia 16 e do dia 13 após a inoculação, (temperatura de 25° e 30°C respectivamente) enquanto que nas plantas controlo (sem stress) só foi possível registar diferenças significativas entre plantas infectadas e não infectadas a partir do dia 29, nas duas temperaturas. Nas plantas de baixa disponibilidade hídrica e infectadas com o nemátode, atingiram-se valores mínimos de potencial hídrico de -5,07 e -6,33 MPa para 25° e 30°C respectivamente. Uma diminuição significativa de valores de potencial hídrico registou-se mais cedo na temperatura mais elevada (fig.17).

✓ Taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração

O decréscimo do potencial hídrico de base reflecte-se nas relações hídricas e nas trocas gasosas das plantas levando a uma diminuição gradual da condutância estomática e consequentemente da transpiração e da taxa fotossintética de *P. pinaster* e *P. radiata* em situações de stress e em plantas inoculadas com nemátode. Em *P. pinea*, à semelhança do que ocorre com o potencial hídrico, não se verificaram diferenças significativas na condutância estomática, na transpiração e na taxa fotossintética e entre as plantas não infectadas e as inoculadas com *Bursaphelenchus xylophilus*.

Verificam-se algumas variações ao longo do período de estudo nos 4 parâmetros fisiológicos analisados em especial nas plantas controlo, em ambas as temperaturas, relacionado provavelmente com a quantidade de água disponível no solo ou com as condições microclimáticas prevalecentes em cada dia. Por exemplo em *P. pinaster* a 25°C, 13 dias após a inoculação, verifica-se um aumento nas plantas controlo de condutância estomática e fotossíntese coincidente com valores elevados de água no solo, o que poderá ter provocado a aberturas dos estomas e por isso maior taxa fotossintética (fig.13 e 15). No mesmo dia a 30°C a quantidade de água disponível foi menor (fig.13), podendo ter induzido ao fecho dos estomas e por isso menor condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética. Também em *P. pinea* a taxa fotossintética apresenta inicialmente valores mais elevados na estufa de 30°C, ao contrário do que seria de esperar, provavelmente relacionado com quantidade de água disponível no solo.

Apesar desta variabilidade subjacente às condições ambientais presentes durante o período das medições fisiológicas é possível verificar diferenças evidentes entre os diferentes tratamentos: temperatura, água e nemátode.

Em *P. pinaster* e *P. radiata*, a condutância estomática (gs) e a transpiração (E) são mais reduzidas nas plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica e nestas, estes parâmetros apresentam valores

muito inferiores nas plantas inoculadas com nemátode. As diferenças nestes parâmetros entre plantas não inoculadas e inoculadas com nemátode vão-se acentuando à medida que decorre o tempo após inoculação. Também a taxa fotossintética apresenta valores mais elevados nas plantas controlo, apresentando valores menores quanto maior a severidade do tratamento ou seja em plantas com reduzida disponibilidade hídrica e infectadas com nemátode. Em *P. pinea* tal como seria de prever, verificam-se diferenças nas medições de condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética entre as plantas controlo e as plantas sujeitas a stress hídrico, com valores mais reduzidos nestas últimas. No entanto não se verificam diferenças nestes parâmetros entre as plantas não inoculadas e as plantas inoculadas com nemátode indicando tratar-se de uma espécie resistente a este organismo patogénico (fig.16).

Como seria de esperar, em *P. pinaster* e *P. pinea* os valores de condutância estomática são mais reduzidos nas plantas sujeitas a maiores temperaturas ($T=30^{\circ}\text{C}$), pois nestas condições os estomas tendem a fechar e consequentemente a sua condutância diminui.

Em *P. pinaster* 20 dias após a inoculação, em ambas as temperaturas o valor de gs das plantas inoculadas com nemátode e sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica apresentam valores muito próximos de zero, denotando assim um fecho estomático em condições de stress. Nestas condições as plantas inoculadas com nemátode apresentam potenciais hídricos muito baixos, inferiores a -5 MPa, valor a partir do qual se verificam danos irreversíveis segundo alguns autores (Mota e Vieira, 2008). De facto a taxa fotossintética apresenta valores negativos como uma consequência provável de danos irreversíveis ao nível do aparelho fotossintético.

Em *P. radiata*, em qualquer dos tratamentos os valores de condutância estomática, transpiração e fotossíntese diminuem progressivamente após a inoculação com nemátode, atingindo valores próximos de zero, nas plantas sujeitas a reduzida disponibilidade hídrica e infectadas com nemátode. Esta espécie apresenta um elevado grau de susceptibilidade à infecção por nemátode tendo sido a que apresenta maiores diferenças nos parâmetros estudados quer em condições mais mésicas quer em condições de maior stress.

Através da análise estatística (GLM, Teste de Wilks), utilizando a média do potencial hídrico em cada tratamento ao longo das medições, verifica-se que, em *P. pinaster*, o efeito da temperatura (T), da infecção com o nemátode (N) e da disponibilidade hídrica (H) são significativos. Verifica-se ainda que a interacção da temperatura com o nemátode é igualmente significativo ($p < 0,001$, tabela IV), do mesmo modo o efeito da interacção do nemátode com a disponibilidade hídrica também é significativa ($p = 0,002$). Em *P. pinea*, o efeito da interacção do nemátode com a disponibilidade de água não se mostrou significativo, tal como o efeito do nemátode com a temperatura. A análise sintomatológica comprova esta análise estatística, isto porque ao longo do período experimental, verifica-se que as plantas se mantiveram

com um reduzido grau sintomatológico, apresentando agulhas verdes e viçosas em qualquer tratamento de temperatura e disponibilidade de água ao contrário do que aconteceu com *P. pinaster*. Em *P. radiata*, a mesma análise estatística revelou um efeito significativo da temperatura, da infecção com o nemátode e da disponibilidade hídrica ($p < 0,001$, tabela IV). Do mesmo modo, se verificou que o efeito da interação da temperatura com o nemátode ($p = 0,003$) e do nemátode com a disponibilidade hídrica ($p = 0,001$) são significativos (Tabela IV).

Tabela IV. Resumo da análise estatística, Teste de Wilks, para as três espécies de *Pinus*, estudo dos efeitos para os factores: temperatura (T), nemátode (N), disponibilidade de água (H), e interações: temperatura vs nemátode (T*N), temperatura vs disponibilidade de água (T*H), nemátode vs disponibilidade de água (N*H) e temperatura vs nemátode vs disponibilidade de água (T*N*H); com base nas médias do potencial hídrico. Os valores a negrito representam os valores significativos ($p \leq 0,05$).

	<i>Pinus pinaster</i>			<i>Pinus pinea</i>			<i>Pinus radiata</i>		
Efeito	Value	F	p	Value	F	p	Value	F	p
T	0,083	50,878	0,000	0,065	33,237	0,000	0,138	10,446	0,001
N	0,099	41,861	0,000	0,303	5,282	0,000	0,042	37,972	0,000
H	0,065	66,348	0,000	0,017	131,291	0,000	0,016	100,246	0,000
T*N	0,280	11,816	0,000	0,724	0,879	0,565	0,185	7,364	0,003
T*H	0,734	1,663	0,184	0,321	4,661	0,001	0,797	0,425	0,846
N*H	0,452	5,566	0,002	0,589	1,607	0,167	0,151	9,370	0,001
T*N*H	0,554	3,697	0,013	0,708	0,948	0,511	0,599	1,116	0,418

Os resultados do potencial hídrico, de taxa fotossintética, de condutância estomática e de transpiração estão em concordância, evidenciando a susceptibilidade das plantas à infecção com o nemátode, em especial das espécies de *Pinus pinaster* e *Pinus radiata*, pois todos eles demonstram uma resposta fisiológica à infecção com *Bursaphelenchus xylophilus*, demonstrando, como seria de esperar, progressivamente valores mais reduzidos com o avançar da infecção. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com estudos anteriores realizados por Fukuda et al., 1992 e Kwan-Soo Woo et al., 2010.

Os resultados obtidos, sugerem que indivíduos de *P. pinaster*, em ambiente mais mésico de temperaturas mais amenas e maior disponibilidade hídrica parecem demonstrar uma maior resistência ao nemátode. Contudo, o aumento gradual da temperatura média e de períodos de seca prolongados que se espera vir a ocorrer de acordo com as previsões de futuras alterações climáticas, poderão vir a potenciar a susceptibilidade desta espécie à infecção por este nemátode. Isto significa que o número de indivíduos de

P. pinaster afectados poderá vir a aumentar nas regiões mais a norte, devido à mediterraneização progressiva do clima.

Os resultados comprovam a maior resistência de *Pinus pinea* à infecção pelo nemátode comparativamente às outras espécies em estudo. Actualmente, em Portugal, apesar de *P. pinea* e *P. pinaster* coexistirem, apenas esta última espécie é afectada pelo NMP (Mota et al., 1999). Esta resistência de *P. pinea* comprovada através do presente estudo, levanta a hipótese da diferenciação na composição celular dos seus tecidos, ou mesmo na diferença de produtos químicos sintetizados pela espécie na presença de *Bursaphelenchus xylophilus*, que a tornem resistente. Esta hipótese conduz à necessidade de estudos futuros para perceber quais as causas ou factores que determinam a resistência desta espécie.

Na área de distribuição natural de *P. radiata*, (América do Norte) não foi encontrado nenhum caso de árvore afectada. Na Califórnia, onde *B. xylophilus* e o seu vector (*M. carolinensis*) são endémicos, *P. radiata* não tem sido afectado pelo NMP, o que poderá sugerir uma coevolução de árvores nativas resistentes ou tolerantes ao nemátode, na América do Norte (Sathyapala, 2004). No entanto, o presente estudo demonstra que em caso de infecção induzida esta espécie é susceptível e que as condições de temperatura e disponibilidade hídrica (especialmente escassez hídrica e temperaturas elevadas) favorecem o desenvolvimento da doença. Este resultado está de acordo com Futai e Furano (1979, in Jikumaru et al., 2000) que identifica *P. radiata* como uma das espécies susceptíveis ao nemátode, ideia que é mais tarde confirmada também por Mamiya (1983) e Ferreira (2000).

2.4. CONCLUSÃO

Das três espécies em estudo, confirma-se a susceptibilidade ao nemátode *Bursaphelenchus xylophilus*, de *P. pinaster* e *P. radiata* em oposição à resistência de *P. pinea*. Verificou-se com o presente estudo que *P. pinaster*, em diferentes condições de temperatura e disponibilidade de água, apresenta uma resposta fisiológica à infecção induzida com o nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. *P. radiata*, responde de forma idêntica a variações de temperatura e disponibilidade hídrica, na presença do nemátode. *P. pinea* não apresenta qualquer resposta fisiológica face à infecção induzida com o nemátode, mesmo nas condições de reduzida disponibilidade hídrica ou temperatura mais elevada.

Este estudo sugere alguma resistência de *P. pinaster* em condições de disponibilidade hídrica e temperaturas médias (25°C), contudo alerta para um alastramento desta doença a zonas actualmente de menor temperatura, se se cumprirem as previsões de alterações climáticas, no que concerne ao aumento da temperatura e períodos de seca prolongados. O estudo sugere ainda que se existirem alterações na preferência alimentar do insecto vector, ou se surgir um novo vector com dieta alimentar associada a *P. radiata*, esta espécie, poderá ser afectada naturalmente pelo nemátode da madeira do pinheiro.

O presente estudo permite concluir que condições ambientais associadas aos factores de stress (temperaturas mais elevadas e stress hídrico) favorecem o desenvolvimento da doença do nemátode da madeira do pinheiro, aumentando a susceptibilidade dos pinheiros a esta doença.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, através de inoculação de plantas jovens em condições controladas conseguiu-se comprovar que a susceptibilidade à doença varia com a espécie de pinheiro e que os factores ambientais, tais como temperatura e disponibilidade hídrica, têm uma influência directa no estabelecimento da doença do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. Das três espécies em estudo com potencial de risco, comprovou-se que *Pinus pinaster* e *Pinus radiata* são espécies susceptíveis, em especial em condições de temperatura elevada (na ordem dos 30°C) e de reduzida disponibilidade hídrica. *Pinus pinea* demonstrou ser uma espécie resistente à infecção induzida com nemátode, mesmo em condições adversas de temperatura e stress hídrico.

No campo verificou-se maior vitalidade nos pinhais de *P. pinaster* sujeitos a uma maior gestão de limpeza de matos e de árvores infectadas com o nemátode. Contudo, no campo, ao contrário do que aconteceu em estufa, não se conseguiu comprovar o efeito das condições ambientais no estabelecimento da doença, devido a lacunas operacionais já referidas.

Este estudo sugere o possível alastramento da doença a outras espécies, como é o caso particular de *P. radiata*, podendo desta forma, existir mais espécies susceptíveis, que actualmente só não são infectadas naturalmente devido à preferência do insecto vector por *P. pinaster*, como ocorre em Portugal. Não existem casos publicados de presença natural de nemátode em Portugal, associado a *P. radiata* ou outra espécie que não *P. pinaster*, contudo, alterações na preferência alimentar de *Monochamus galloprovincialis* ou existência de outro insecto com capacidade de vector do nemátode, poderão alastrar esta doença a outras espécies susceptíveis. Tendo em conta as previsões de alterações climáticas e em particular de mediterraneização de Portugal, o presente estudo sugere ainda, a possibilidade de avanço desta doença para outras zonas que actualmente não são afectadas, pela ausência de condições ambientais favoráveis à implementação da doença.

O facto de *Pinus pinea* se demonstrar resistente à infecção induzida com *Bursaphelenchus xylophilus* conduz à necessidade de estudos futuros pesquisarem mecanismos de resistência desta espécie à doença.

Fica com este trabalho comprovado que condições ambientais de stress, tais como temperaturas mais elevadas e stress hídrico, contribuem para o estabelecimento do nemátode da madeira do pinheiro, potenciando o seu desenvolvimento em espécies susceptíveis, como é o caso de *Pinus pinaster* e *Pinus radiata*.

5. Bibliografia

- ABELLEIRA, A.; PICOAGA, A.; MANSILLA, J.P.; AGUIN, O. 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, Causal agent of Pine Wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwester Spain. *Plant Disease*. 95(6):766.
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5ª ed. Estados Unidos da América: Elsevier Academic Press. 922.
- BAIN, J.; HOSKING, G. P. 1988. Are NZ *Pinus radiata* plantation threatened by pine wilt nematode *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *New Zealand Forestry*. 32(4): 19-21.
- BERGONCI, J.I.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M.A.; SANTOS, A. O. 2000. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(8): 1531-1540.
- CASTROVIEJO, S. (Coor. Geral) - *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, 1986/2011. Acedida em Outubro de 2011 em <http://www.floraiberica.es/>
- FERREIRA, M.C. 2000. Insectos vectores do nemátodo da madeira do pinheiro. Plátano-Edições Técnicas. 136.
- FONSECA, L.; FERNANDES, P.; MENDES, A.; MÁGUAS, C.; CORREIA, O.; ABRANTES, I. 2012. The effect of water stress and temperature on the pathogenicity of the pinewood nematode to *Pinus* spp. *European Society of Nematologists*, Turkey.
- DOZANO, Y.; YOSHIDA, N. - Application of the logistic curve for the population growth of pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, on the cultures of *Botrytis cinerea*. *J. Jpn. Forest Society*. (1974). 56: 146 -148.
- EVANS, S.; EVANS, H.; IKEGAMI, M. 2008. Modeling PWN-Induced Wilt Expression: A Mechanistic Approach. In MOTA, M, VIEIRA, P. (eds). 2008. *Pine Wilt Disease: a Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. [S.L.]: Springer Science. 259-278.
- EVANS, H.; McNAMARA, D.; BRAASCH, H.; CHADOEUF, J.; MAGNUSSON, C. 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vector in the genus *Monochamus*. *Bulletin OEPP/EPPO* 26: 199-249.
- FRANCARDI, V.; PENNACCHIO, F. 1996. Note sulla bioecologia di *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) in Toscana e in Liguria (Coleoptera Cerambycidae). *Redia* (Firenze). 79:153–169.

- FRANCO, J.A.; AFONSO, M.L.R. 1984. Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lisboa: Franco, J.A. (Ed) /Escolar Editora, 1971/2003. Vol. I-III.
- FUKUDA, K.; HOGETSU, T.; SUZUKI, K. 1992. Photosynthesis and water status of pine wood nematode infected pine seedlings J. Jpn. Forest Society. 74: 1-8.
- FUTAI, K.; FURUNO, T. 1979. The variety of resistance among pine-species to pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*. Bulletin of Kyoto University Forestry. 51:23–26.
- ICHIHARA, Y.; FUKUDA, K.; SUZUKI, K. 2000. Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissues of *Pinus thunbergii*. Plant Disease. 84:675-680.
- I.M. I.P. 2011. Normais climatológicas Setúbal. Acedido em Outubro de 2011 em www.meteo.pt.
- IKEDA, T. 1996. Xylem dysfunction in *Bursaphelenchus xylophilus* – infected *Pinus thunbergii* in relation to xylem cavitation and water status. Ann. Phytopathol Soc. Jpn. 62: 554-558.
- JIKUMARU, S.; TOGASHI, K. 2000. Temperature Effects on the Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nemata: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Journal of Nematology. 32(1):110–116.
- KIYOHARA, T.; TOKUSHIGE, Y. 1971. Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto pine trees. Journal of Japanese Forest Society. 53:210–218.
- KURODA, K.; MAMIYA, Y. 1986. Behavior of the pine wood nematode in pine seedlings growing under aseptic conditions. Transactions of 97th Meeting of the Japanese Forestry Society. 471-472.
- KURODA, K.; YAMADA, T.; ITO, S. 1991. *Bursaphelenchus xylophilus* induced pine wilt: factors associated with resistance. European Journal of Forest Pathology. 21: 430 – 438.
- LINIT, M. J. 1988. Nematode-Vector Relationships in the Pine Wilt Disease System. Journal of Nematology. 20(2):227-235.
- LOUSÃ, M. 2004. Bioclimatologia e Séries de Vegetação de Portugal. Lazaroa. 25:83-85.
- MAMIYA, Y. 1975. Behavior of *Bursaphelenchus lignicolus* in the wood of pine seedlings and pathological responses of pine to nematode infection. Transactions of the Annual Meeting of the Japanese Forestry Society. 86: 285–286.
- MAMIYA, Y. 1983. Pathology of the pine with disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. Annual Reviews of Phytopathology. 21: 201–220.

- MAMIYA, Y. 1984. The pine wood nematode. In: Nickle WR (ed) Plant and insect nematodes. 589–626.
- MAMIYA, Y. 1985. Initial pathological changes and disease development in pine trees induced by the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annals of the Phytopathological Society of Nematology*. 51: 546–555.
- MAMIYA, Y. 2008. Movement of the pinewood nematode, *Bursaphelenchu xylophilus*, through tracheids in diseased pine trees. *Japanese Journal of Nematology*. 38(1). 41-44.
- MAMIYA, Y.; ENDA, N. 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica*. 18:159–162.
- MARTÍNEZ-VILALTA, J.; PRAT, E.; OLIVERAS, I.; PIÑOL, J. 2002. Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Oecologia* 133:19-29.
- McELRONE, A.J.; POCKMAN, W.T.; MARTÍNEZ-VILALTA, J.; JACKSON, R.B. 2002. Variation In xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytologist* 163 : 507-517.
- MOTA, M. M.; BRAASCH, H.; BRAVO, M.A.; PENAS, A.C.; BURGERMEISTER, W.; METGE, K.; SOUSA, E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*. 1:727-734.
- MOTA, M.M.; TAKEMOTO, S.; TAKEUCHI, Y.; HARA, N.; FUTAI, K. 2006. Comparative Studies between Portuguese and Japanese Isolates of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*. 38 (4): 429-433.
- MOTA, M, VIEIRA, P. (eds) 2008. Pine Wilt Disease: a Worldwide Threat to Forest Ecosystems. [S.L.]: Springer Science. 405.
- MOTA, M. M.; FUTAI, K.; VIEIRA, P. 2009. Pine Wilt Disease and The Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. 253-274. In CIANCIO, A.; MUKERJI, G. (eds). 2009. Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes. 350.
- NAVES, P.; SOUSA, E.; QUARTAU, J. 2007. Winter dormancy of the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in Portugal. *J Appl Entomol*. 131:669–673.
- NAVES, P.; SOUSA, E. 2008. Threshold temperatures and degree-day estimates for development of post-dormancy larvae of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Pest Science*. 82:1-6.

- NAVES, P. M.; SOUSA, E.; RODRIGUES, J. M. 2008. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in the Pine Wilt Disease Affected Zone, Southern Portugal. *Silva Lusitana*. 16(2): 133 – 148.
- PAJARES, J. A.; ÁLVAREZ, G.; IBEAS, F.; GALLEGO, D.; HALL, D.R.; FARMAN, D.I. 2010. Identification and Field Activity of a Male-Produced Aggregation Pheromone in the Pine Sawyer Beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Chemical Ecology*. 36: 570 – 583.
- PENAS, A. C.; BRAVO, M.A.; NAVES, P.; ÁCIO, L.B.; SOUSA, E.; MOTA, M. 2006. Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. *Annals of Applied Biology*. 1-11.
- POLOMSKI, J.; RIGLING, D.; SCHWEINGRUBER, F. 2008. Development of External and Internal Symptoms in Pine Seedlings (*Pinus sylvestris*) Due to Inoculation with *Bursaphelenchus vallesianus*. 335-344, In MOTA, M, VIEIRA, P. (eds) *Pine Wilt Disease: a Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. [S.L.]: Springer Science.405.
- PROENÇA, D.N.; FRANCISCO, R.; VIEIRA S., C., LOPES, A., FONSECA, L., ABRANTES, I.M.O. & MORAIS, P.V. 2010. Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with Pine Wilt Disease. *PlosONE* 5:1-9.
- RUTHERFORD, T.; RIGA, E.; WEBSTER, J. 1992. Temperature-mediated behavioral relationships in *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and their hybrids. *Journal of Nematology*. 24: 40–44.
- SATHYAPALA, S. 2004. Pest Risk Analysis Biosecurity Risk to New Zealand of Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). MAF Biosecurity Authority Forest Biosecurity group. 6-36.
- SIKODA, E. J.; MALEK, R. B. 1991. Influence of Temperature on Development of Pine Wilt in Scots Pine. *Journal of Nematology*. 23(2):188-193.
- SOUSA, E.; BRAVO, M.A.; PIRES, J.; NAVES, P.; PENAS, A.C; BONIFÁCIO, L.; MOTA, M.. 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*. 3: 89–91.
- SUZUKI, K.; KIYOHARA, T. 1978 Influence of water stress on development of pine wilting disease caused by *Bursaphelenchus lignicolus*. *European Journal of Forest Pathology*. 8: 97 – 107.
- SUZUKI, K. (2004). Pine wilt disease – a threat to pine forests in Europe. In *The pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology Monographs and Perspectives*, vol. 1 (eds.M. Mota and P. Vieira), pp. 25–30. E. J. Brill, Leiden, The Netherlands.

- TOGASHI, K., 1989. Studies on population dynamics of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) and spread of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). Bull. Ishikawa-Ken forest exp. Sta. 20: 136-142.
- TOGASHI, K. 1990. Life table for *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) within dead trees of *Pinus thunbergii*. Jpn J Entomol. 58:217–230.
- TOGASHI, K.; JIKUMARU, S. 2007. Evolutionary change in a pine wilt system following the invasion of Japan by the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Ecological Research. 22: 862–868.
- UTSUZAWA, S.; FUKUDA, K.; SAKAUE, D. 2005. Use of magnetic resonance microscopy for the non-destructive observation of xylem cavitation caused by pine wilt disease. Phytopathology. 95: 737–743.
- VICENTE, C.; ESPADA, M.; VIEIRA, P.; MOTA, M. 2012. Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. European Journal of Plant Pathology. 133: 497.
- WANG, Q. 2002. Sexual Selection of *Zorion guttigerum* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae) in Relation to Body Size and Color. Journal of Insect Behavior. 15:5.
- WEBSTER, J. 2004. The pine wood nematode: Implications of factors past and present for pine wilt disease. 55–64. In MOTA, M.; VIEIRA, P. (eds) The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Nematology Monographs & Perspectives, vol. 1. Leiden-Boston: Brill Academic Publishers.
- WINGFIELD, M. J., BEDKER, P. J., BLANCHETTE, R. A. 1986. Pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* on Pines in Minnesota and Wisconsin. Journal of Nematology. 18(1):44-49.
- WOO, K.; YOON, J.; WOO, S. Y.; LEE, S.H.; HAN, S.; HAN, H.; BAEK, S.G.; KIM, C. 2010. Comparison in disease development and gas exchange rate of *Pinus densiflora* seedlings artificially inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. Forest Science and Technology. 6: 110-117.
- YANO, S. 1913. Investigation on pine death in Nagasaki prefecture. Sanrin-Kouhou. 4:1–14 (in Japanese).
- ZHAO, B. G.; FUTAI, K.; SUTHERLAND, J.R.; TAKEUCHI, Y. (eds) 2008. Pine Wilt Disease. Japão: Springer. 459.
- ZIMMERMANN, M.H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Berlin, Springer-Verlag.

ANEXOS



Figura A1 – Exemplos de *Monochamus galloprovincialis* capturados, ampliado (tamanho real: 1,5 – 2 cm).



Figura A2 – *Pinus pinaster* perfurado por *Monochamus galloprovincialis*.



Figura A3 – Inoculação em *Pinus pinea*.



Figura A4 – *Pinus pinaster*, tratamento sem stress e sem nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A5 – *Pinus pinaster*, tratamento sem stress e com nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A6 – *Pinus pinaster*, tratamento com stress e sem nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A7 – *Pinus pinaster*, tratamento com stress e com nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A8 – *Pinus radita*, tratamento sem stress e sem nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A9 – *Pinus radita*, tratamento sem stress e com nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A10 – *Pinus radita*, tratamento com stress e sem nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.

63



Figura A11 – *Pinus radita*, tratamento com stress e com nemátode, temperatura 30°C, 6ª semana após inoculação.



Figura A12 – *Pinus radita*, tratamento sem stress e sem nemátode, temperatura 25°C, 8ª semana após inoculação.



Figura A13 – *Pinus radita*, tratamento sem stress e com nemátode, temperatura 25°C, 8ª semana após inoculação.



Figura A14 – *Pinus radita*, tratamento com stress e sem nemátode, temperatura 25°C, 8ª semana após inoculação.

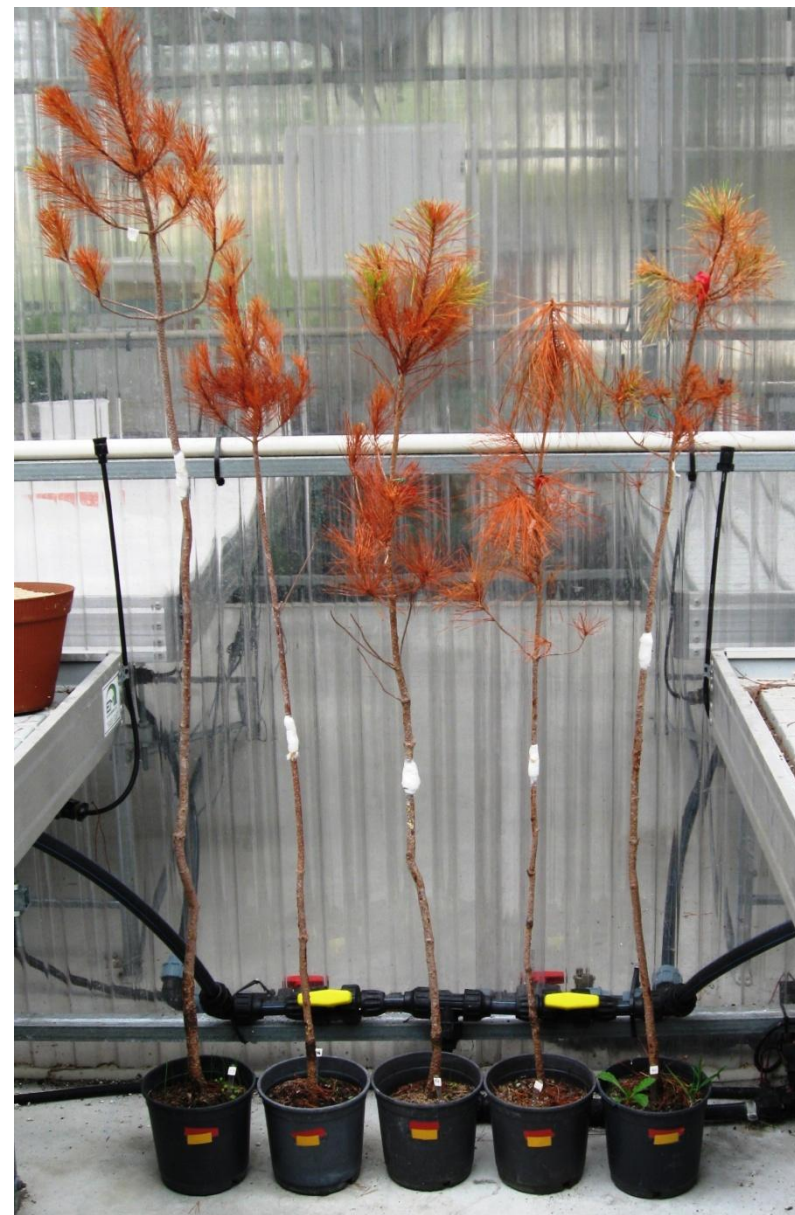


Figura A15 – *Pinus radita*, tratamento com stress e com nemátode, temperatura 25°C, 8ª semana após inoculação.